

Kumamoto.

8. Yoshimura K., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Matsushita, S.: Proviral DNA and Turnover Levels in Aviremic Long-Term Non-Progressors (LTNPs); A Temporary Goal for Patients under HAART. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.
9. Matsushita, S., Honda A., Kenai, A., Shibata, J., Koito, A., Yoshimura K.: Long-Term Follow-Up Study for the Change of the Reservoir for HIV-1 on Highly Active Antiretroviral Therapy. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. 2005. 7. 1-5. Kobe.

(国内学会)

1. 松下修三：シンポジウム-HIV/AIDSの臨床における最近の問題点-イントロダクション-.第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
2. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、小糸厚、松下修三：HAARTにより長期間ウイルスが抑制された症例のpDNAの推移. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
3. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上俊夫、小糸厚、松下修三：広範囲HIV-1中和単クローン抗体のin vitro 逃避ウイルスの誘導と解析. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.
4. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、

松下修三：長期間HAART有効症例における残存HIVとintegration siteの関連性. 第19回日本エイズ学会学術集会. 2005.12.1-3. 熊本.

5. 松下修三：A broadly reactive neutralizing antibody and evolution of escape mutants in vitro. 第8回白馬シンポジウム in 鹿児島—エイズ治療の最前線—.2005.11.3-4.鹿児島.
6. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲HIV-1単クローン抗体のin vitro 逃避ウイルスの誘導と解析.第8回白馬シンポジウム in 鹿児島—エイズ治療の最前線—.2005.11.3-4.鹿児島.
7. 柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス1型gp120のC3領域変異による抗V3中和抗体に対する中和抵抗性の獲得. 第53回日本ウイルス学会総会、横浜、2005.11.20-22.
8. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸厚、松下修三：広範囲HIV-1単クローン抗体のin vitro 逃避ウイルスの誘導と解析. 第6回熊本エイズセミナー. 2005.9.15. 熊本.

知的所有権の出願・取得状況：
特になし

分担研究報告書

「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」

細胞膜融合を標的にした薬剤の耐性機序

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター第三室長

研究協力者 宮内浩典 国立感染症研究所エイズ研究センター第三室

研究要旨：従来の抗 HIV-1 化学療法を中心であるウイルス酵素阻害剤に加えて新たに膜融合阻害剤が開発され、すでにこの薬剤に対する耐性ウイルスの出現も報告されている。その耐性機構の解析には、未だ全容が明らかとはなっていない膜融合過程そのものの解明とともに、膜融合過程を簡便かつ迅速に評価できる系の開発が重要な課題となる。本研究では膜融合後半に寄与するとされる gp41 膜貫通部分の変異体解析を通じて膜融合機構の解析を進めるとともに、試験管内膜融合評価系の開発を行っている。膜融合はいままでその寄与が明らかでなかった膜貫通部分の変異でも影響を受けることが明らかになるとともに、膜融合能の顕著な低下によってもウイルスの複製そのものはあまり大きな影響を受けないことも明らかとなった。

A. 研究目的

今までの抗 HIV-1 化学療法の主体はウイルス酵素を標的としたものであるが、既存薬剤に対する薬剤耐性ウイルスの出現や薬剤の副作用の問題から今までの薬剤とは作用機序の異なる薬剤開発が試みられている。近年 HIV-1 エンベロープタンパク質を介した膜融合分子機構の基礎的研究の成果として、膜融合を対象とした薬剤の開発、臨床使用が達成された。しかし、HIV-1 の持つ可塑性、多様性はこれらの薬剤に対しても、耐性ウイルスの出現を可能にし、すでに耐性ウイルスが報告されている。現在仮定されている膜融合過程の分子機構に基づいてその耐性機構の解析が行われている。しかし一方で、膜融合過程の全容は必ずしも明らかではない。そこで本研究では耐性機構解析に必要な膜融合過程そのものの解析及び、耐性の程度を評価する際に有用である膜融合能評価系の開発を目的に研究を進めている。

B. 研究方法

1) gp41 サブドメインの膜融合過程への寄与—

今まで膜融合過程の中心をになうのは gp41 細胞膜外部分とされてきたが、膜融合後期はそれ以外の部位の寄与が重要であると考えられている。膜融合能に影響を与えうる領域の同定は将来の遺伝子型による膜融合阻害剤耐性ウイルスの評価の際にどの部分を塩基配列決定の検査対象領域とすればよいかを決める際に重要な意味を持つ。そこでわれわれは膜融合への寄与が明らかでない膜貫通部分の変異体を作成し、その膜融合に与える影響を検討した。昨年度の結果では膜貫通部分全体を他の膜タンパク質の膜貫通部分で置換した際にのみ、顕著な影響を認め、単独の点変異ではその影響が見られなかった。従って今年度は両者の中間に位置する 2 個以上の点変異を持つ変異体を作成し解析した。

2) 定量的膜融合アッセイ系の検討—昨年度膜融合能を定量的に評価できる系として融合細胞間での T7 RNA ポリメラーゼの移行を用いるアッセイ系を確立したが、膜融合の初期過程をも検討できる新たな系の開発を目指して

予備的実験を行った。1)、2)ともその解析はクレードBの感染性分子クローン HXB2 および培養細胞株(Jurkat, COS, 293T)を用いて行い、臨床サンプル等のヒト由来試料や動物等は使用しておらず倫理面で問題となる実験、調査は含まれていない。

C. 研究結果

gp41 膜貫通部分には膜貫通ヘリックス間相互作用に寄与すると考えられるアミノ酸配列モチーフ GXXXG (G: グリシン、X: いずれかのアミノ酸) を含む G⁶⁹⁰G⁶⁹¹XXG⁶⁹⁴ 配列が存在する(使用分子クローン HXB2 中 6 9 0-6 9 4 番目のアミノ酸に相当)。昨年度、gp41 膜貫通部分全体を GXXXG 配列を有する異種タンパク質のそれで置換した場合には膜融合能が低下したが、GXXXG 配列中に存在するグリシン残基をアラニン、あるいはロイシンに置換した点変異体は膜融合能に影響をほとんど与えなかったことを報告した。本年度は複数のグリシンを同時に変異させる点変異体を作成し、ウイルス複製、膜融合などへの影響を解析した(Fig. 1)。それぞれの変異エンベロープ蛋白質を発現ベクターに組み込み昨年度も使用した T7RNA polymerase の融合細胞間での移動を指標とする膜融合アッセイ系で評価した結果を Fig. 2 に示す。3個存在するグリシン残基のうちどの2個をロイシンに置換しても膜融合能の低下は野生型の7割ほどに保たれた。G690, G694 両者をロイシンに変えた上で(2L 変異体)、G 6 9 1 をアラニン、フェニルアラニン、ロイシンに変化させた変異体(2L+691X 変異体)についてはアラニン、フェニルアラニン、ロイシンの順に膜融合能が低下することがわかった。いずれの変異体も細胞表面でのエンベロープ蛋白質の発現レベルに変化は見られなかったため (FACS による、data not shown) これらの結果はそれぞれの変

異体の膜融合能を反映していると考えられた。変異を導入したウイルスの複製能を CD4 陽性細胞株 Jurkat を用いて評価したところ、膜融合能にほぼ相応した複製能の低下が認められた(data not shown)。置換変異体の蛋白質発現をトランスフェクションされた COS 細胞由来の細胞及びウイルス溶解液で比較検討した結果、691 番目にロイシンを導入した変異体(2L+691L)ではウイルス粒子へのエンベロープ蛋白質の取り込みが低下していることが明らかとなった。

膜融合の in vitro アッセイ系として T7RNA polymerase の融合細胞間の移行を指標とする系を用いてきたが、この系では膜融合直後にはまだ流入した T7 RNA polymerase による転写、翻訳は行われておらず測定までの間にラグタイムを生じる。このラグタイムを短縮、解消する目的で split luciferase の可能性を検討した。すでに文献に記載のあるルシフェラーゼを N, C 末側部分に分け、それぞれ相互作用できる蛋白質 A, B と融合させ同一細胞内に同時に発現させると luciferase 活性の回復が見られることを確認した (data not shown)。

D. 考察

昨年の研究では gp41 膜貫通部分の、グリシンを単独で他のアミノ酸へ変異させても機能的に著変を認めなかった。これは HIV-1 gp41 の変異に対する寛容性の大きさを示すもので、VSV で同様の変異がその機能に大きな影響を与えるのとは対照的である。今回の結果では3個あるグリシンの内任意の2個をロイシンに変えても機能はある程度保たれることから、改めて gp41 膜貫通部分の有する変異に対する寛容性が確認された。しかし 690, 694 位のグリシンをロイシンに変えた後 691 位のグリシンを種々のアミノ酸に変化させると膜融合能やウイル

スへのエンベロープ蛋白質取り込みが影響を受けることから、寛容性には限度があり、機能に変化を与えるには昨年度示したように膜貫通部分全般にわたっての置換を行う必要はないことがわかった。いずれにしても膜融合に影響を与えうる部分はエンベロープ蛋白質のさまざまな部位でありうることが確認され、将来的にエンベロープの遺伝子型解析のためには部分的塩基配列解析ではなくその全長にわたる解析が必要であることが示唆された。今まで使用してきた T7RNA ポリメラーゼの細胞間移行に基づく細胞膜融合孔の形成度の評価は膜融合を定量的に評価できる点で有用であるが、レポーター遺伝子の転写、翻訳までにかかる時間が必要なため膜融合過程の初期把握できない問題点がある。Split luciferase の予備実験の結果は膜融合能測定系を改善できる可能性のあることを示唆している。

E. 結論

細胞膜融合能は膜貫通部分の点変異でも低下することが明らかとなった。したがって、エンベロープ蛋白質の機能評価にはエンベロープの一部ではなく全体を補足できるようなシステムの構築が望ましい。定量的膜融合評価では split luciferase 等を導入すればそのラグタイム短縮の可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Sugiura W, Yamamoto N and Matsuda Z

Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. J. Virol. 79(8):4720-9, 2005

2. Miyauchi K, Curran , Matthews E, Komano , Hoshino T, Engelman DM and Matsuda Z, Mutations of Conserved Glycine Residues within the Membrane-Spanning Domain of Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 Can Inhibit Membrane Fusion and Incorporation of Env onto Virions. JJID in press

2. 学会発表

1. Miyauchi K, Curran R, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman D M and Matsuda Z, The rotational phase of the localized region of gp41 membrane-spanning domain alpha-helix affected the Env biogenesis. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor NY, USA. May 24-29, 2005

2. Miyauchi K, Curran R, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman D M and Matsuda Z, The role of the additional glycine residue within a conserved GXXXG motif of the membrane-spanning domain of HIV-1 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor NY, USA. May 24-29, 2005

3. 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛 The function of membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 in Env biogenesis 第53回日本ウィルス学会学術集会、2005年11月20日-22日、横浜

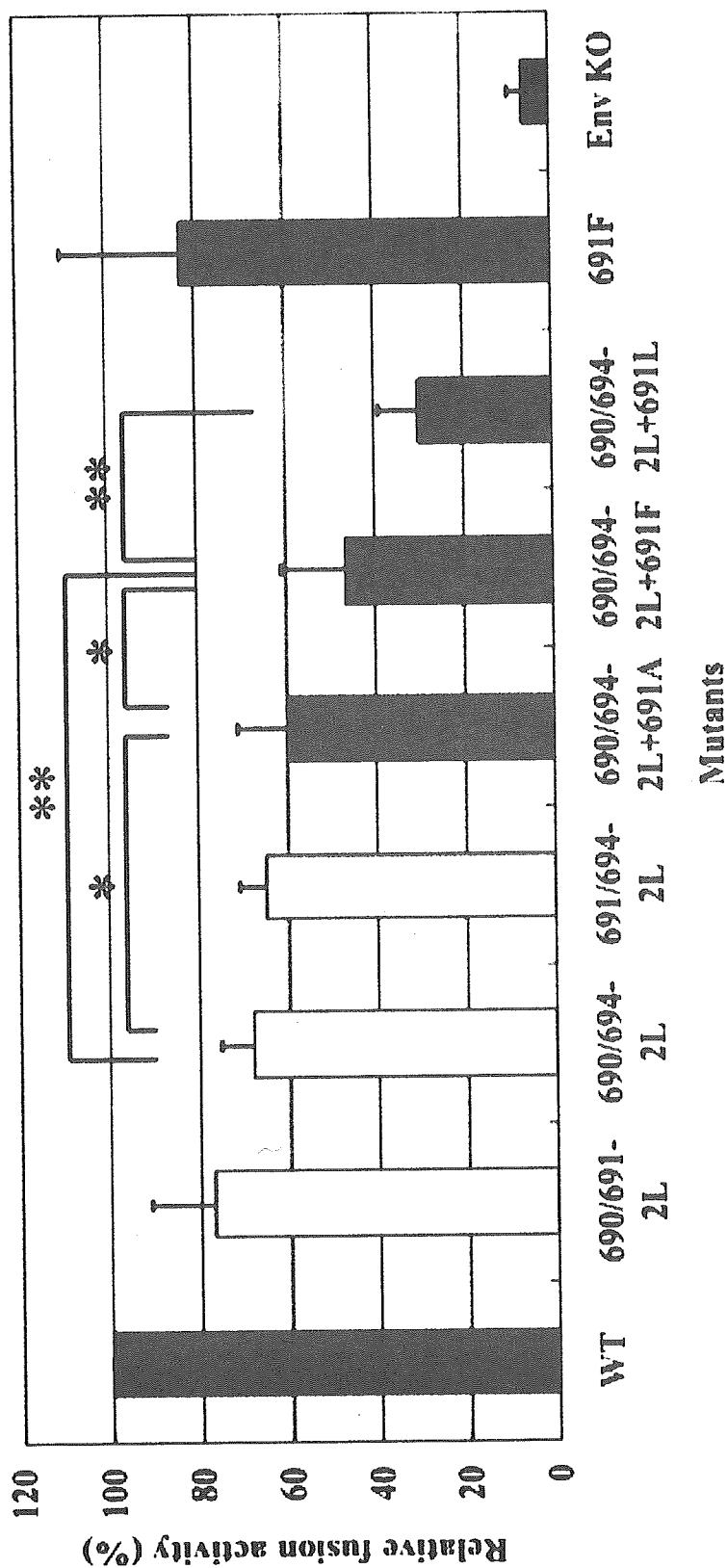
4. 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛 HIV-1 gp41 の膜貫通ヘリックス間相互作用-GXXXG モチーフ変異体の解析 第53回日本ウィルス学会学術集会、2005年11月20日-22日、

横浜

5. 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛 HIV-1
の Env 生合成過程における膜貫通領域の寄与
第28回日本分子生物学会年会、2005年1
2月7日ー10日、福岡

6. 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛 HIV-1
gp41 膜貫通領域に存在する GXXXG 配列の解析
第28回日本分子生物学会年会、2005年1
2月7日ー10日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況: 該当なし



Statistically significant (**) and insignificant (*) difference

Fig. 2 Fusogenicity of Envs

T7RNAポリメラーゼ移行反応による膜融合能の評価。縦軸は野生株を100%としたときの各変異体の相対的膜融合能を表す。変異の統計的有意差を**を用いて示した。

HIV 薬剤耐性の変異の解析とデータベース構築に関する研究

分担研究者 山口由美 産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター

研究要旨

HIV 薬剤耐性の調査、研究において、薬剤耐性変異の情報や、感染者の臨床、投薬情報などが膨大に蓄積している。薬剤耐性変異研究を情報解析の立場からサポートし、変異の出現頻度予測に繋げる為、HIV の配列の変異情報の整備、重要な薬剤耐性変異の立体構造への効果の調査を行った。

A. 研究目的

抗 HIV の薬として、逆転写阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が主に使用されているが、薬剤耐性変異が出現する。効率の良い治療法の確立のためには、薬剤耐性変異の実態を把握し、薬剤投与後に起こりうる変異の範囲を予測することが重要である。そもそも HIV は突然変異率が高いので、薬剤耐性変異として知られているもの以外の変異が膨大にある。そこで、逆転写酵素とプロテアーゼの変異の実態を整備することが重要である。

国立感染症研究所では、国内の HIV 感染者の大規模のサーベイランスが行われており、感染者の臨床、投薬情報や HIV の遺伝子の塩基配列データなどを含んだデータベースが構築されつつある。そこで、本年度は以下のような研究を行った。

- (1) HIV-1 のプロテアーゼについて、変異の実態を掴む。薬剤耐性変異として知られているものだけでなく、全てのアミノ酸サイトにおいて、解析を行う。既知の薬剤耐性変異の情報収集を行って、変異の解析とあわせてサブデータベース化する。
- (2) 各々のアミノ酸サイトにおける変異のパターンはサイトごとに完全に独立している訳ではなく、サイト間にて変異が相互に干渉しあう

ケースが報告されている。本研究では相互情報量を用いた解析により、全てのアミノ酸サイト間での干渉の度合いを求め、治療歴等の条件による変化を観測することにより、薬剤耐性との関連や変異の蓄積の傾向を明らかにする。また、立体構造や分子のダイナミクスとの関連を明らかにする。

B. 研究方法

- (1) HIV プロテアーゼの各アミノ酸サイトの変異の量を、出現するアミノ酸の種類数、各アミノ酸の出現頻度、アミノ酸の多様性、で評価した。HIV-1 プロテアーゼの各アミノ酸サイトの変異の量を評価した。そして、変異の量をタンパク質の2次構造、3次構造との対応を調べた。
- (2) HIV-1 プロテアーゼの配列を用い 99 のアミノ酸サイト間の相互情報量を求めた。まず、入力配列を未治療の状態にて採取したサンプル(n=2049)、indinavir の投与を受けたサンプル(n=737)、同じく nelfinavir (n=598)、saquinavir (n=215)の4つの群に分け、それぞれの群において、アミノ酸サイト間の相互情報量を Hoffman らの手法[Virology 314 (2003)]

536-548] を用いて求め、STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE [http://hivdb.stanford.edu] に登録されている阻害活性値の変化や、立体構造情報との対応を取った。さらに統計的な有意差を求めるために100,000回のランダムサンプリングによるpermutation testを行い、より確からしいサイト間の関連を明らかにした。

C. 研究成果

(1) 多様性に富むアミノ酸サイトは、特に立体構造の外側に主に見られた。30、90番目のアミノ酸サイトなど、薬剤耐性変異が報告されているサイトの変異の量は、極めて抑えられていた。例えば、HIV-1全体(342本の配列)で見ても、2種類のアミノ酸しか出現せず、機能的制約が強いことが分かる。1種類のアミノ酸しか出現しないサイトは、13サイト検出された。(2) 全てのアミノ酸サイト間において、0.05以上の相互情報量を持ち、かつ統計的な有意差($p < 0.01$)において関連があると判断されたペアは、未治療のサンプルにて3ペア、治療歴のあるサンプルにて合計69ペア存在した。indinavir, nelfinavir, saquinavirのそれぞれの群において、サイト間の干渉のパターンに違いが見られた。さらに、変異の組み合わせで分類したところ、極性のアミノ酸が関与しているケースに比べ、非極性のアミノ酸が関与しているケースが多かった。また、近距離で直接相互作用するケースだけでなく、離れた2つのサイトが干渉しているケースも数多く観測された。さらに、阻害活性の変化(fold resistance)と相互情報量との関係を図2に示した。これら2つの値は弱い相関ではあるが($R=0.34$)、fold resistanceが大きいほど、相互情報量が大きい傾向にあることが判明した。

D. 考察

(1) 薬剤耐性変異の報告のあるサイトは、プロテアーゼの機能に関わっているため、変異の程

度は抑えられている。他のアミノ酸サイトで変異の見られないサイトが13箇所あったが、機能的な重要性のために、そのアミノ酸が1種類しか受け入れられなくなっていると考えられる。

(2) アミノ酸サイト間での干渉と阻害活性値との関係、さらに立体構造との対応をとることにより、変異の蓄積の傾向を把握することができる。例えば、nelfinavir投与群でのみ観測された30番目と88番目のサイト間での正の干渉において、D30N/N88Dの変異体の頻度が期待値よりも大きかったが(頻度と期待値の差= $\Delta P=0.11$)、D30/N88Dの変異体の出現頻度は非常に低かった($\Delta P=-0.13$)。この現象は負電荷の2つのアスパラギン酸が近距離に相互作用し、酵素を不安定化させることに起因すると考えられ、D30N/N88変異体の頻度が比較的に高いことを考慮に入れると、D30N/N88D変異体は30→88の順に変異が蓄積している可能性が高いことが導き出せる。またStanford HIV DRUG RESISTANCE DATABASEに登録されている阻害活性値の変化から、nelfinavir以外の薬剤にて30-88間での干渉が起こらないのはD30N変異が薬剤耐性を起こさないことに起因することも推察された。この他、サイト間の干渉のパターンは薬剤によって大きく異なり、干渉の度合いと阻害活性との間の関連が示唆されたことから、サイト間の干渉に薬剤の阻害活性が大きく関与していることが判明した。

変異の蓄積は薬剤耐性の度合い(阻害活性の変化)、ウイルスの適応度(酵素触媒能)のバランスによって傾向が異なり、変異体の出現頻度、阻害活性、立体構造情報などを統合することで、変異の蓄積の傾向、またそのメカニズムに構造的な観点から迫ることができると考えられる。

E. 結論

(1) 出現するアミノ酸の種類数を解析すること

により、機能的制約の範囲を推定することが可能である。今後解析に利用する配列の本数が増えても、出現するアミノ酸の種類数は、それぞれサイトの機能的制約の範囲で、やがて飽和に達する。今後、サブタイプごとの解析との比較、異なるサイト間の多型の関係の分析により、プロテアーゼ、逆転写酵素のアミノ酸の多型の実態を明らかにしていく。

(2) 関連のある2つのサイト間の変異を解析し、薬剤の阻害活性値との対応をとることで、変異の蓄積の傾向に関する情報を収集することに成功し、配列の頻度解析・立体構造や fold resistance など各種実験結果との対応をとるために有用なツールを作成した。また、立体構造との対応から、静電的な相互作用よりも疎水相互作用やVDW相互作用などのように、非静電的な相互作用をするケースが多いことが判明した。また、距離が離れているサイト間での干渉も数多く存在し、さらに以前の分子動力学計算からも2つの近接したサイトの変異が離れた場所の揺らぎを変化させるという結果が得られたことから、変異の蓄積がタンパク質全体のダイナミクスにどのような変化をもたらすかを捉えていくことが重要であると考えられる。

今後本研究で用いた情報に加え、3つ以上のサイト間での関連、酵素触媒能、分子動力学シミュレーションを用いた酵素の安定性といった情報をさらに付加し、統合することで変異の

蓄積の予測、最適な治療薬の選択、薬剤耐性のメカニズムの解明に迫ることができると考えられる。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takemura T, Ekwilanga M, Bikandou B, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Sadayuki Ohkura S, Harada H, Takehisa J, Ichimura H, Parra H-J, Nende M, Mubwo E, Sepole M, Hayami M and Miura T (2005) A novel SIV from black mangabey (*Lophocebus aterrimus*) in Democratic Republic of Congo. Journal of General Virology 86:1967-71.

- (2) 山口由美 ウイルスの表面構造と遺伝的多様性 化学と工業 58(10):1181-1184. (2005)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ無し

Amino acid variation in HIV-1 Protease

All subtypes of HIV-1 including subtype O and SIVcpz
342 sequences

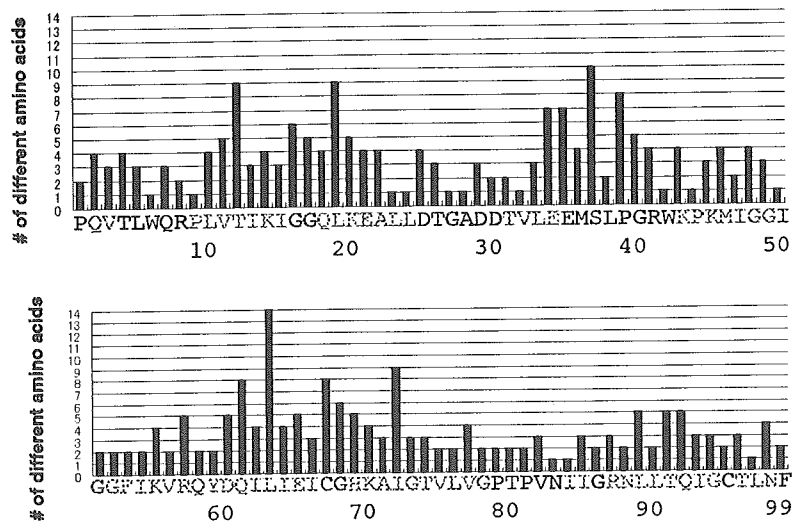


図1. HIV-1 プロテアーゼのアミノ酸の多様性の評価。ここでは、各アミノ酸サイトに出現するアミノ酸の種類数が示されている。

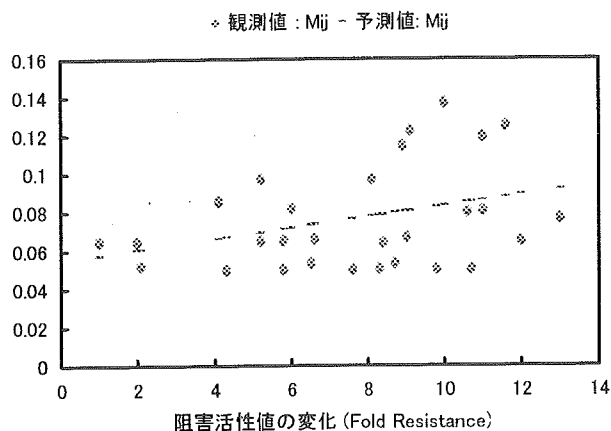


図2. Indinavir 群における相互情報量と阻害活性値の変化との関係

Fold resistance の値は i 番目、 j 番目のサイトに置ける変異を含む全ての変異体の実験値から算出した第一四分位置の値。[STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE
http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/PR_Phenotype.cgi]

II. 分担研究報告書

【調査研究グループ】

薬剤耐性遺伝子検査のバリデーションに関する研究

分担研究者名 金田 次弘

共同研究者 藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、伊部史朗（名古屋医療センター臨床研究センター血液免疫研究部）、吉田繁（北海道大学病院検査部）、浅黄司（仙台医療センター臨床検査科）、正兼亜季（石川県立中央病院中央検査部）、大家正泰（新潟大学大学院医歯学総合研究科）、渡邊香奈子（新潟保健環境科学研究所）、潟永博之（国際医療センターエイズ治療研究センター）、松田昌和（国立感染症研究所エイズ研究センター）、貞升健志（東京都健康安全研究センター微生物部）、岡田清美（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所）、近藤真規子（神奈川県衛生研究所微生物部）、秦眞美（愛知県衛生研究所微生物部）、溝上泰司（大阪医療センターHIV/AIDS 先端医療開発センター）、森治代（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課）、南留美（九州医療センター内科）

研究要旨

HIV-1 感染症患者は今後も増加する傾向にあることから、HAART 治療を行う上で重要な判断材料となる HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査はより重要性を増し、需要が求められると考えられる。しかし現在、全国で行われている HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査は、施設によって検査に用いる試薬が異なる。多くの施設は国立感染症研究所または国際医療センターから指導を受けた手法が基本となっているが、RNA の抽出法、プライマーの配列は各施設間で多岐にわたっている。HIV-1 の遺伝子型は、用いる手法によって解析結果が異なる可能性が考えられるため、各施設間による薬剤耐性検査結果に違いが存在することが懸念される。そこで、国内の HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法および技術の均一化、並びに精度向上を目的として、検査を実施している全国の施設に対してバリデーションを実施した。その結果、バリデーションに参加した全 15 施設のうち 10 施設で全ての薬剤耐性アミノ酸変異を検出していた。バリデーションに用いた HIV-1 が有するアミノ酸変異と異なる検査結果については、その原因を解明するため、各施設で使用しているプライマー、シーケンスの波形データ、および塩基配列・アミ

ノ酸配列のファイル調べた。その結果、異なる解答を引き起こすと考えられる原因が明らかとなった。

今回のバリデーションの結果を基に、全国の施設における薬剤耐性遺伝子型検査手法の改良を検討し、精度向上を図ることの重要性が明らかになった。

A. 研究目的

HAART 治療中の HIV-1 感染患者に出現する薬剤耐性 HIV-1 の遺伝子型を調べることは、効果的に治療を継続する上で必須である。また、未治療の新規 HIV-1 感染者からも薬剤耐性 HIV-1 の存在が報告されていることから、薬剤耐性遺伝子型検査は今後 HIV-1 感染症治療にとって非常に重要であると考えられる。しかし、HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法は、施設間で多岐にわたっており、そのため検査技術および精度が均一かつ十分信頼に足るものであるかは不明である。そこで、本研究では全国の施設で実施されている HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査の内容を把握することと、問題点を明らかにする為、各施設に対してバリデーションを進めている。また、その結果を基に各施設と問題点を討議し、検査内容を改善することで、全国の

HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査法の精度向上を目的とした。本年度は、臨床検体を対象にしたバリデーションの前段階として、まず、遺伝子型が均一な HIV-1 クローンを用いたバリデーションを実施した。

B. 研究方法

1. バリデーションに用いるクロン化 HIV-1 の作製

臨床検体中の HIV-1 には複数種類の遺伝子型が混在しているヘテロ型が多く見られる。そのため、臨床検体を用いてバリデーションを実施すると、各施設間における検査手法の違いにより検査結果の多様化が十分に考えられたため、今回のバリデーションに用いるには不適当とみなした。そこで、遺伝子型が単一であるクロン化 HIV-1 を作製した。臨床検体由来の薬剤耐性 HIV-1 と、HIV-1 HXB2 株の感染性クロンを用いて、2 種類の組み換え感染性クロンを作製した (図 1)。①多剤薬剤耐性アミノ酸変異の一つである Q151M を含むクロン#1、②アミノ酸挿入による薬剤耐性変異を含むクロン#2 である。作製した感染性クロン#1、2 を培養細胞に遺伝子導入し、組み換えウイルスを得た。

2. 各施設での HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査の実施

HIV-1 クロン#1、2 から RNA を抽出し、バリデーションに参加している各施設へ送付、薬剤耐性検査を実施していただいた。検査後、検出された薬剤耐性アミノ酸変異、ならびに薬剤耐性以外のアミノ酸変異も報告していただいた。薬剤耐性アミノ酸変異は HIV-1 HXB2 を標準株とし、IAS-USA パネルに基づいて判定するように指定した。また、検査に用いたプライマーの配列、シークエンサーの波形データ、得られた塩基配列およびアミノ酸配列のファイルも提出していただいた。

3. 検査結果の判定

各施設から報告された検査結果をクロンが有するアミノ酸変異と比較して、異なる結果についてはその原因を解明する為、提出されたファイルを詳細に調べた。

C. 研究結果

バリデーションには全国の 15 施設が参加した。検査結果の報告書に対して正誤の判定を行い、一覧表を作製した (図 2 A・E)。

具体的には、クロン#1 のプロテアーゼ遺伝子領域 (図 2 A) に存在する薬剤耐性変異は L63P、A71T、V77I であり、その他のアミノ酸変異は V3I、E35D、S37N、R41K、K70R である。薬剤耐性アミノ酸変異について誤答を報告した施設は A、G の 2 施設であり、どちらも A71T についてのものであった。施設 A は A71V と報告しており、施設 G は A71T を検出していなかった。V3I については施設 C、D、H が、E35D については施設 G、H が、S37N については施設 C、H が、R41K については施設 G、H が、K70R については施設 H が検出していなかった。また、HIV-1 クロン#1 には存在していないはずのアミノ酸変異を施設 E、F、G、H が報告していた (図 2 A)。

クロン#1 の逆転写酵素領域 (図 2 B) に存在する薬剤耐性アミノ酸変異は A62V、V75I、F77L、F116Y、Q151M、その他のアミノ酸変異は S68G、T69V、E122K、Q197E、R211K である。薬剤耐性アミノ酸変異は全ての施設で正しく検出されていた。その他のアミノ酸変異、S68G については施設 C が、E122K については施設 C、H が、Q197E と R211K については施設 C が検出していなかった。また、HIV-1 クロン#1 には存在していないはずのアミノ酸変異を施設 H が報告していた (図 2 B)。

クロン#2 のプロテアーゼ遺伝子領域 (図 2 C) に存在する薬剤耐性アミノ酸変異は L10I、L63P、V77I、L90M であり、その他のアミノ酸変異は V3I、I15V、S37D、I93L である。薬

剤耐性アミノ酸変異について誤答を報告した施設はD、Fの2施設であった。施設DはL90Mを検出しておらず、施設FはL10IをL10LSと報告していた。その他のアミノ酸変異である、V3Iについては施設C、D、Hが検出しておらず、S37Dについては施設HがN37Dと報告していた。また、HIV-1 クローン#2には存在していないはずのアミノ酸変異を施設E、Fが報告していた(図2A)。

クローン#2の逆転写酵素領域(図2D)に存在する薬剤耐性変異はM41L、T69S-SG(insertion)、G190A、L210W、T215Y、その他のアミノ酸変異はV35T、T39A、K43E、E122K、I135T、R172K、D177E、Q207H、R211K、L214F、K238Sである。薬剤耐性アミノ酸変異について異なる結果を報告した施設はKの1施設であり、T69S-SG(insertion)を検出していなかった。その他のアミノ酸変異、V35T、T39Aについては施設Gが、E122Kについては施設C、Hが、I135Tについては施設Hが、L214Fについては施設C、F、HがK238Sについては施設Lが検出していなかった。また、HIV-1 クローン#2には存在していないはずのアミノ酸変異を施設C、H、M、Nが報告していた(図2D)。

HIV-1 クローン#1、2を通してクローンが有するアミノ酸変異を正しく報告した施設は3施設であった。クローンおよび遺伝子領域別に具体的に挙げると、クローン#1のプロテアーゼ遺伝子領域では7施設(図2A)、逆転写酵素遺伝子領域では9施設(図2B)であった。クローン#2のプロテアーゼ遺伝子領域では10施設(図2C)、逆転写酵素遺伝子領域では7施設(図2D)であった。

D. 考察

薬剤耐性アミノ酸変異の検出に関して全て正解した施設は全15施設中10施設(66.6%)であった。しかし、その他のアミノ酸変異を含め全てのアミノ酸変異に関して全て検出し報

告した施設は全15施設中3施設(20%)であった。

報告された検査結果に見られた誤答について、その原因を調べた結果以下の傾向が確認された。

1. RT-PCRに用いたプライマー配列のミス
マッチ(図3A)

HIV-1 クローン#1には挿入変異が存在しており、そのためプライマーDRPRO3を用いた施設では本来のHIV-1 DNAを増幅できていなかった。報告されたアミノ酸変異は、コンタミネーションによって増幅されたHIV-1 DNAを基に解析した結果と考えられ、そのために本来は存在しないアミノ酸変異を検出したものと考えられる。

2. 波形データ解析時のミス(図3B・D)

シーケンスの波形データに出現したノイズにより、塩基の読み取りが正確に行われていなかった(図3B、C)。また、塩基配列をフォワード、リバースの両方向からシーケンスした際に、信頼性の高い波形データからの解析結果を採用していなかった(図3D)。

3. 塩基配列を解析する際のミス

波形データから得られた塩基配列を、アミノ酸配列に変換する際のミスがあった。

4. アミノ酸配列から、薬剤耐性アミノ酸変異を検出する際の見落とし

5. 報告書作成時の記入ミス

以上が今回見られた誤答の原因として考えられる。これらに対する対処法として、①HIV-1の塩基配列と保存性の高いプライマーの使用、②シーケンサーには劣化したキャピラリー、ゲル、バッファーを用いない、③シーケンス反応には精度の高いプライマー(HPLC精製)を用いる、④シーケンスはフォワード、リバースの両方向から行い、ノイズがなく正確に解析出来る波形データからの情報を採用する、⑤人為的なミスを防ぐ、を考えている。

今回明らかとなった問題点は、薬剤耐性には関連しないアミノ酸変異部位で多くみられた

が、薬剤耐性アミノ酸変異部位でも十分に起こりうるミスである。薬剤耐性遺伝子型検査は、HIV-1 感染症患者に対する HAART 治療を進める際に基盤となる、非常に重要な検査であるため、検査結果にはミスの起こることがないように細心の注意が必要である。今回明らかになった、起こりやすいミスとその原因を全国の施設で討議し、検査内容を改良できるように努めたい。続けて、HIV-1 感染症患者からの臨床検体を用いてより実践的なバリデーションを実施し、薬剤耐性遺伝子型検査の精度向上を目指す。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

図1 バリデーション用クローン化HIV-1の作製

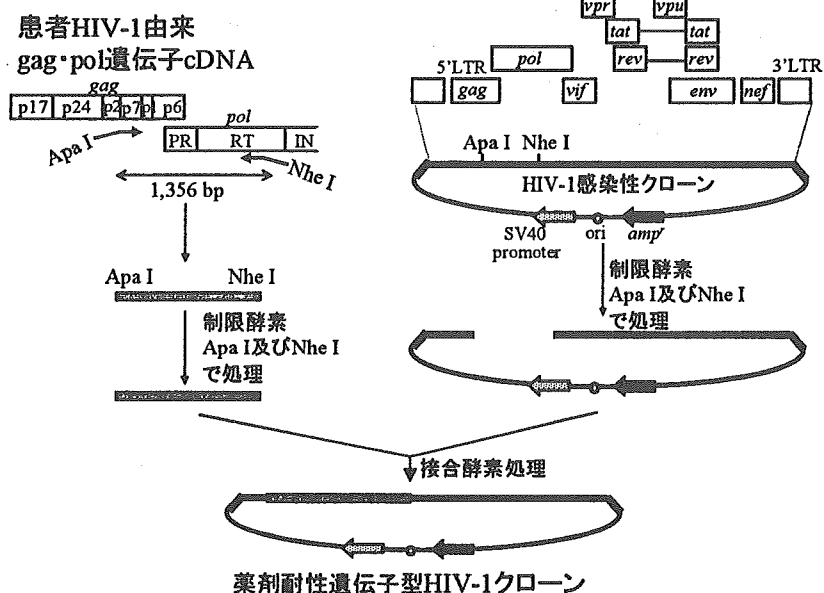


図2A バリデーションの解答一覧(1)

HIV-1
クローン
#1
PR領域

変異	正解	7施設	A	B	C	D	E	F	G	H
V3I	○	○	○	○(I3Vと記載)	-	-	○	○	○	-
E35D	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-
S37N	○	○	○	○	-	○	○	○	○	-
R41K	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-
L63P	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
K70R	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-
A71T	●	●	●(A71Vと記載)	●	●	●	●	●	-	●
V77I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
							D29DN (○)	C95W (○)	I15V (○)	I15V (○)
									I62V (○)	Q18L (○)
									I93L (○)	R57K (○)
										I62V (○)
										I72E (○)
										I93L (○)

● IAS-USAパネルに記載されている薬剤耐性アミノ酸変異

○ IAS-USAに記載されていないアミノ酸変異

図2B バリデーションの解答一覧(2)

HIV-1
クローン
#1
RT領域

変異	正解	9施設	C	D	E	H	I	J
A62V	●	●	●	●	●	●	●	●
S68G	○	○	-	○	○	○	○	○
T69V	○	○	○	○	●	●	●	●
V75I	●	●	●	●	●	●	●	●
F77L	●	●	●	●	●	●	●	●
F116Y	●	●	●	●	●	●	●	●
E122K	○	○	-	○	○	-	○	○
Q151M	●	●	●	●	●	●	●	●
Q197E	○	○	-	○	○	○	○	○
R211K	○	○	-	○	○	○	○	○
						F214L (○)		

- IAS-USAパネルに記載されている薬剤耐性アミノ酸変異
○ IAS-USAに記載されていないアミノ酸変異

図2C バリデーションの解答一覧(3)

HIV-1
クローン
#2
PR領域

変異	正解	10施設	C	D	E	F	H
V3I	○	○	-	-	○	○	-
L10I	●	●	●	●	●	L10LS (○)	●
I15V	○	○	○	○	○	○	○
S37D	○	○	○	○	○	○	○(N37D と記載)
L63P	●	●	●	●	●	●	●
V77I	●	●	●	●	●	●	●
L90M	●	●	●	-	●	L90LM (●)	●
I93L	○	○	○	○	○	○	○
					E34EK (○)	R41K (○)	
						L63A (○)	
						T96ST (○)	

- IAS-USAパネルに記載されている薬剤耐性アミノ酸変異
○ IAS-USAに記載されていないアミノ酸変異

図2D バリデーションの解答一覧(4)

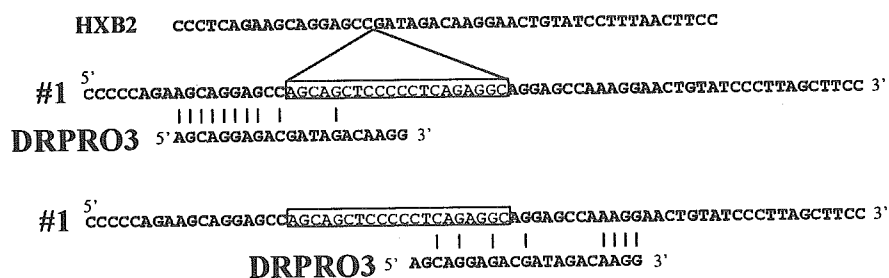
HIV-1
クローン
#2
RT領域

変異	正解	7施設	C	F	G	H	K	L	M	N
V35T	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○
T39A	○	○	○	○	-	○	○	○	○	○
M41L	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
K43E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
T69S (insertion)	●	●	●	●	●	●	○	●	● (T69SG)	●
E122K	○	○	-	○	○	-	○	○	○	○
I135T	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○
R172K	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D177E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G190A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Q207H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L210W	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
R211K	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L214F	○	○	-	-	○	-	○	○	○	○
T215Y	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
K238S	○	○	○	○	○	○	○	-	○	○
			A272P (○)						T69S (○)	I311/T (○)
			K277R (○)			F214L (○)				

- IAS-USAパネルに記載されている薬剤耐性アミノ酸変異
- IAS-USAに記載されていないアミノ酸変異

図3A プライマーのミスマッチ

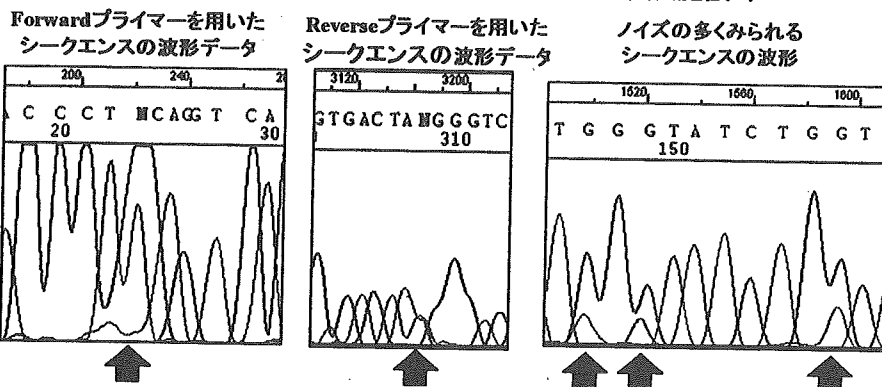
DRPRO3プライマーとHIV-1クローン#1との相同性



DRPRO3と挿入変異を持つHIV-1クローン#1は相同性が低い

図3B シーケンス波形データ解析時のミス(1)

HIV-1クローン#2 PR領域: 薬剤耐性アミノ酸変異である
L10Iの塩基配列解析(施設F)

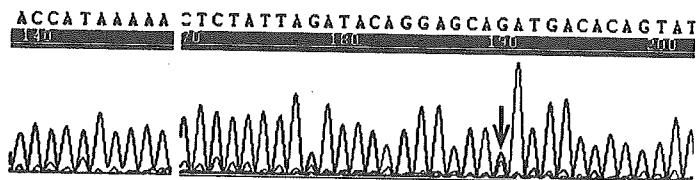


⇒ 本来ATAの塩基配列をTYAとして解析

⇒ L10Iのアミノ酸変異を L10LS と報告

図3C シーケンス波形データ解析時のミス(2)

HIV-1クローン#1 PR領域: 本来は存在しないアミノ酸変異
D29DNを検出(施設E)



塩基Gを、GとAのヘテロとして検出
アミノ酸変異D29DNを報告

全体的にノイズによる
小さなピークが多い

⇒ 波形の読み取りに影響を与えている