

検査計画書

1. 検査名 チトクローム P450 2B6 (CYP2B6) の遺伝子検査
2. 検査責任者 _____ 科 _____
3. 検査協力者 _____ 科 _____
 _____ 科 _____
 _____ 科 _____
4. 検査の背景および目的

efavirenz (EFV) は、現在の抗 HIV 療法のキードラッグであるが、副作用としてふらつきや鬱傾向などの精神神経症状を伴うことが問題となっている。EFV の投与量は 1 日 1 回 600mg であるが、その血中濃度は個人差が大きく、特に血中濃度の高い患者ほど副作用の出現率も高くなることがわかっている。EFV は肝酵素である CYP2B6 により分解されるが、CYP2B6 遺伝子には多型があり、516 番目の核酸が G から T に置換する変異(G516T)をホモで保有する患者(日本人で 3-5%)では、EFV の血中濃度が著しく高くなることがわかっている (図 1)。

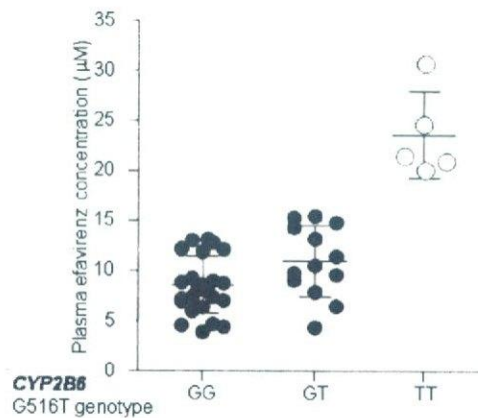


図1: CYP2B6遺伝子型とEFV濃度

Tsuchiya, et al. Biochem Biophys Res Commun 319: 1322-1326, 2004. より改変

また、これらの遺伝子型の患者では、EFV 投与量を 1 日 400mg に減量しても、抗 HIV 効果は十分に保たれ、副作用が軽減することが、国立国際医療センターを中心とする多施設共同研究で明らかとなった。400mg の投与量でもまだ高い血中濃度（内服後 10-14 時間で 18,000nM 以上）を維持する患者では、更に 200mg にまで安全に減量できることも明らかとなっている。

5. 検査の概要

CYP2B6 遺伝子検査の同意が得られた患者から血液を 2ml 採取し、検査会社 BML において DNA を抽出し、インベーターアッセイにより CYP2B6 G516T 変異について解析する。検体のラベル・BML への検査依頼伝票には、匿名化 ID 番号のみを使用し、生年月日・イニシャルは使用しない。個人情報を守られる。

6. 検査費用の支出

検査費用は、厚生労働省エイズ対策事業「抗 HIV 薬の血中濃度に関する臨床研究班」（主任研究者：国立感染症研究所 杉浦互、分担研究者：国立病院機構大阪医療センター薬剤科 桑原健）に申請することにより、研究班より BML に支払われる。研究班には、匿名化 ID 番号のみ伝えられ、患者名などの個人情報は伝えられない。

7. 検査結果の報告

CYP2B6 遺伝子の検査結果は、BML より匿名化 ID 番号とともに、当院の検査依頼医師に親展の報告書で伝えられる。研究班には通知されない。

8. EFV の投与

患者が CYP2B6 G516T をホモで保有していた場合、EFV の投与量を 1 日 400mg に減量する。400mg の投与量でもまだ高い血中濃度（内服後 10-14 時間で 18,000nM 以上）を維持する場合は、200mg まで減量する。

チトクローム P450 2B6 遺伝子検査の説明文書

1. 検査は任意であり、拒否できること

この検査は遺伝子を調べる検査で、患者さんご自身の判断で、同意することも拒否することもできます。

2. 検査のあらまし

efavirenz (EFV) (商品名：ストックリン) は、現在の抗 HIV 療法の重要な薬剤ですが、ふらつきや酔いなどの副作用を伴うことがあります。この副作用は、EFV の濃度が高い人ほど出やすいことがわかっています。EFV は、肝臓にあるチトクローム P450 2B6 という酵素で分解されますが、この酵素には個人差があり、ある特定の型を持つ患者さんでは、EFV の濃度が非常に高くなることがわかりました。この酵素の型は、血液中の遺伝子を調べるとわかります。EFV の濃度が高くなる酵素の型を持っておられる場合は、EFV の内服量を減らして、副作用を起しにくくすることができます。

3. 検査の方法

血液を 2ml 採取して、検査会社で調べます。名前などの個人情報は検査会社には伝えられません。

4. 検査の費用

検査の費用は、厚生労働省の研究費で支払われ、患者さんの負担にはなりません。

5. 検査結果と EFV の内服量

検査の結果は担当医よりお伝えします。EFV の濃度が高くなる酵素の型を持っておられる場合は、EFV の内服量を減らして、副作用を起しにくくします。

チトクローム P450 2B6 遺伝子検査の同意文書

_____ 病院院長 殿

私は、チトクローム P450 2B6 遺伝子検査について、下記説明者より説明文書を用いて、以下の項目について説明を受けました。

- 検査は任意であり、自由に拒否できること
- 遺伝子の検査をおこなうこと
- 検査の目的と方法
- 検査費用の負担はないこと

以上より、私は、上記の遺伝子検査を受けることに(下記を○で囲んでください)

同意します

同意しません

平成 年 月 日

患者氏名 (署名または記名・捺印)

代諾者氏名 (必要な場合のみ)

(_____)

説明者の所属、氏名 (署名または記名・捺印)

_____科

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

最終年度である今年度は、現在臨床で問題になっている耐性 HIV に対して強い抗 HIV 効果を有するエチニル誘導体の作用機序の解明を構造学的に行った。また、リン酸化反応を deoxycytine kinase が触媒することを明らかとした。In vitro 実験で広く用いられている NL4-3 を長期培養し、自然変異の導入とその複製能に対する影響を調べた。

A. 研究目的

現在、genotype/phenotype assay によって耐性 HIV の出現は早期に検出できるようになったが、例えば D4T に対する耐性機序は依然不明のままであり、比較的簡便な genotype assay では検出が困難である。また本邦でも逆転写酵素（RT）阻害剤に対する多剤耐性 HIV の出現頻度が上昇してきている。これらの現状を踏まえて本研究では RT 阻害剤に対する新たな耐性変異の同定、その機序を解明し、新しい genotype/phenotype assay の確立を行う。この研究成果は、耐性 monitoring や患者に即した HAART の確立に役立つだけでなく副作用を伴いながら効果が減弱した薬剤を投与する無駄を省くことにもつながる。また併せて、新規 RT 阻害剤開発およびそれらに対する耐性変異に関しても解析する。

最終年度である今年度は、1) 既存の耐性 HIV に対しても活性を有するエチニル核酸誘導体の作用機序の解明と臨床応用に向けた基礎的研究および 2) 試験管内で耐性誘導を行ったときに導入されてくる付随変異が薬剤非存在下でも見出されるかについて 2 種類の細胞を用いて検討を行った。

B. 研究方法

- 1) 細胞とウイルス：MT-2 および PM1 細胞、リン酸化酵素欠損亜株を含めた HT1080 細胞、HeLa-CD4/β-galactosidase (MAGI)細胞を使用した。野生型と組換え HIV は pNL4-3 とその組換え体をそれぞれ 293T 細胞に遺伝子導入して作製した。
- 2) エチニル核酸誘導体のリン酸化：エチニル核酸誘導体に対応するリン酸化酵素を同定するために生理的核酸による競合実験を行った。また、リン酸化酵素欠損 HT1080 に CD4 および CXCR4 発現ベクターを遺伝子導入し、HIV 感染を可能とした。これらの細胞に欠損しているリン酸化酵素を補い、エチニル誘導体の活性を検討した。
- 3) エチニル誘導体と RT のモデリング：3D モデリングソフトを用いてエチニル誘導体と RT とのモデリングを行い、耐性 HIV の阻害様式を検討した。
- 4) 長期継代：NL4-3 と NL101 を MT-2 で NL101 を PM1 で約 3 年間継代し、その自然発生的な変異を組み込まれた HIV 遺伝子のほぼすべての塩基配列を決定し、同定した。また各々の複製能を比較検討した。

（倫理面への配慮）

基礎研究しか行っておらず、特に配慮は要らない

と考えられた。

C. 研究結果

1) エチニル誘導体のリン酸化酵素の同定：エチニル誘導体の中で活性の最も強かった 2'-deoxy-4'-ethynyl-2-fluoro-adenosine (EFdA) を生理学的核酸 4 種類と競合させ、抗 HIV 活性の変化を観察したところ、deoxycytidine (dC) 濃度依存的に EFdA の活性が失われた。さらに CD4 と CXCR4 を導入した dC kinase (dCK) 欠損 HT1080 細胞ではほとんど EFdA の活性が認められなかったが、dCK を導入することによりその抗 HIV 活性が回復した (別紙添付図 1)。これらのことから dCK が EFdA の細胞内リン酸化を触媒していると考えられた。

2) モデリング：EFdA がなぜ既存の逆転写酵素阻害剤に対して交差耐性を示さないかをモデリングによって検討した。AZT 耐性でみられる ATP による阻害剤の除去するためには取り込まれた阻害剤と ATP が結合しやすい環境を作らなければならないが、3'-OH を有する EFdA は AZT の 3'-azido と異なり、その除去反応が起こりにくいことを示した。また、K65R や L74V や Q151M 変異で見られた 3'-OH の認識に関しても EFdA はこの部位を修飾していないため影響は見られなかった。一方、steric hindrance を起こす M184V 変異では EFdA の活性が軽度低下したが、モデリングでもその hindrance の程度は 3TC と比べ著しく低く、耐性化しにくいことを示した。

3) NL ウイルスの長期培養：NL4-3 を MT-2 で長期培養 (約 3 年) したところ、塩基置換がもとの配列と混在しているものを含めると 67 個の塩基置換が見られた。NL-101 では 54 個であった。同様に PM-1 細胞で培養した NL101 も 65 個の塩基置換を有しており、その程度はほぼ同程度であった。その半数程度がアミノ酸置換を有するもので

あったが、そのほとんどは臨床分離株等で見られる polymorphism に分類されるものであった。また、塩基置換のうち半数は G から A への変異であり、変異の偏りがみられた。培養を続けてきた細胞で行った複製速度の検討においては transfection 直後の培養を行っていないウイルスと比べ、長期培養によって導入された変異は複製に関して正に働いたが、他の細胞に代えると NL4-3 は負に影響した (別紙添付図 2)。Tat に 11 アミノ酸欠失がある NL4-3 とそれを回復させた NL101 は MT-2 細胞においては約半年間競合培養を行ったがその差は見られなかった。しかしながら、PM1 細胞では NL4-3 のほうがやや優れていた。

D. 考察

最終年度である本年度は 2 つのプロジェクトに関して検討を行った。まず、はじめに滞在耐性株にも効果を示す核酸誘導体であるエチニル化合物、特に EFdA について詳細にその特徴を検討した。この薬剤は静止および活性型リンパ球での発現レベルに差のない dCK によりリン酸化されるので、ヒトに投与した場合、両方のリンパ球で効率よくリン酸化され、その強い抗 HIV 効果を示すと予想され、HIV リザーバーとして体内に長期間存在する静止リンパ球に対する感染にも効果を示すことは重要な点である。さらに立体構造学的にも耐性化しにくいことが示され、既存の耐性機序には影響を受けにくいことが明らかとなった。一方、マウスでの急性毒性も見られておらず、今後この薬剤の臨床開発が期待される。

NL4-3 や 101 を長期間培養することで、ウイルスが細胞にどのように適応していくかを観察し、G から A への高変異が認められた。この自然変異のウイルス複製に対する影響は使用する細胞によって異なっていた。現在までに報告されたウイルス複製能を調べた研究のほとんどが 1 種類の細

胞を用いて行われてきている。特に核酸系 RT 阻害剤耐性ウイルスの複製能は細胞内生理学的核酸の濃度の影響を受けることが用意に予想され、細胞を換えることで RT の酵素反応効率が変化し複製速度に影響する可能性もあり、今後更なる解析が必要になるかもしれない。また、このことはある細胞において複製能が優れていることが直接病原性に関連するとは言い切れないことも示唆する。この研究結果から標準 HIV 株として広く *in vitro* 実験で用いられてきた NL4-3 であっても長期培養によって細胞環境に適応し、多数のアミノ酸置換を有してしまうことは報告に値する。一方で、これは *in vitro* 薬剤耐性誘導を行い導入されてきた変異が耐性に直接関連する 1 次変異であるのか、間接的または関連性の薄い 2 次変異であるかを見極めるために非常に重要な情報を呈している。実際に gp41 領域だけを検討しても fusion 阻害剤の *in vitro* 耐性誘導で 2 次変異と同定されたものが実際に今回の長期培養でも見出されている。このことは gp41 に限らないと考えられ、種々の実験で見出されてくる変異の意義を推定するに当たり重要な情報を提供していると考えられる。

E. 結論

EFdA が多剤耐性 HIV にも効果を示し、臨床応用可能であることを *in vitro* で検討した。また、NL4-3 および 101 を長期培養し、細胞への適応性を検討した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kajiwara K, Kodama E, Matsuoka M. A novel

colorimetric assay for CXCR4 and CCR5 tropic human immunodeficiency viruses. *Antivir Chem Chemother* 17: 215-223, 2006.

Saita Y, Kodama E, Orita M, Kondo M, Miyazaki T, Sudo K, Kajiwara K, Matsuoka M, Shimizu Y. Structural Basis for the Interaction of CCR5 with a Small Molecule, Functionally Selective CCR5 Agonist. *J Immunol*, 177: 3116-3122, 2006.

Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, Kawakami H, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Ikeda S, Kodama E, Matsuoka M, Shinkai H. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem* 49:1506-8, 2006.

Ohrui H, Kohgo S, Hayakawa H, Kodama E, Matsuoka M, Nakata T, Mitsuya H. 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-fluoroadenosine: a nucleoside reverse transcriptase inhibitor with highly potent activity against all HIV-1 strains, favorable toxic profiles and stability in plasma. *Nucleic Acids Symp Series* 50: 1-2, 2006.

2. 学会発表

Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Sato M, Kano M, Ikeda S, Matsuoka M. *In Vitro* Antiviral Activity and Resistance Profile of a Novel HIV Integrase Inhibitor JTK-303/GS-9137. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, Sep 27-30, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

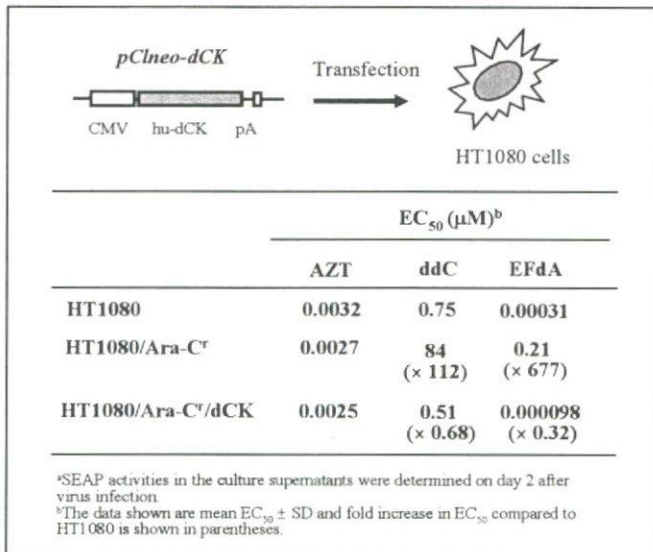


図1. Deoxycytidine kinase (dCK) の影響

araC耐性であるHT1080/araCではdCKが欠失しているため、dCKによってリン酸化されるddCの活性は低下する。同様にEFdAの活性も低下した。dCK発現ベクターをtransfectしてdCKを補うことでこれらの薬剤の活性が回復した。Thymidine kinaseによってリン酸化されるAZTはdCKの影響を受けなかった。また、HT1080細胞はHIVが感染できるようにCD4とCXCR4発現ベクターを組み込んだ。

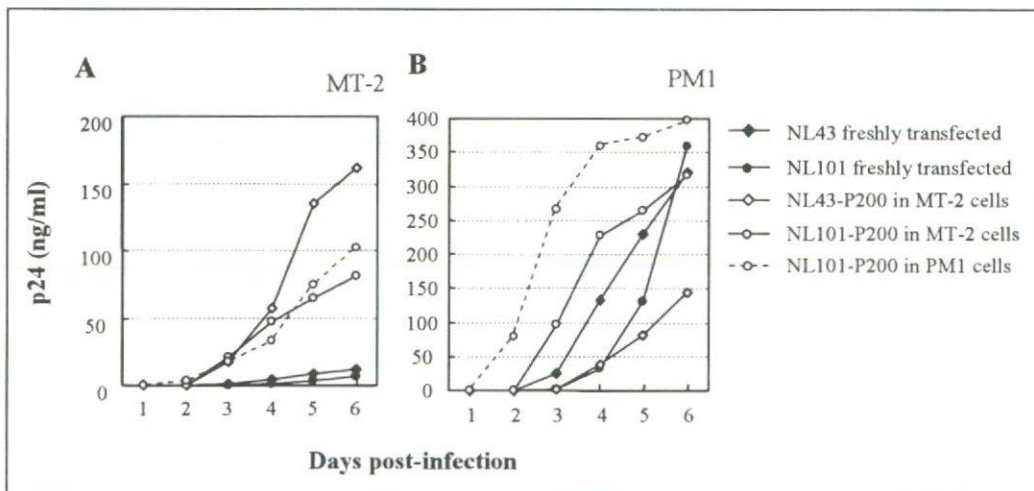


図2. 長期培養HIVの複製能の変化。

導入された自然変異が複製に対してどのように影響するかを(A)ではMT-2、(B)ではPM1細胞を用いて検討した。MT-2細胞ではtransfectによって得られた新規HIVと比べ、長期培養を行ったHIVの複製能は向上していた。PM1でも同様の傾向であったが、MT-2細胞で長期培養したNL4-3はPM1細胞での複製能は新規にtransfectしたウイルスよりも劣っていた。

「薬剤耐性ウイルスの Genophenotyping 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 第2室 室長）

研究要旨 MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」による効率的な感染性分子クローン樹立法を2人の治療中の邦人感染者から継時的に分離したCRF01_AE組換体薬剤耐性ウイルスに適用したところ、総計275個の感染性分子クローンが得られ、その内93クロンの全ゲノム配列を決定した。これらの患者ウイルスの 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傾向が認められたが、env V1/V2 領域はいずれの時期も多様性を保持していた。これらの感染性分子クローン由来ウイルスの薬剤耐性プロファイルをMAGIC-5/SEAP細胞株を用いたPhenotype薬剤耐性試験で解析したところ、AZTではGenotypeとPhenotypeの耐性度は良く相関したが、d4T, 3TCなどのNRTIとIDV, NFVなどのPIではその耐性度に乖離が認められた。特にAPVではGenotypeでは感受性であってもPhenotypeではNaïveウイルスの数十倍の耐性度を示した。本研究で患者由来の薬剤耐性クローンウイルスのGenotypeとPhenotypeを統合するGenophenotyping実験系確立の試みが一定の成功が得られ、樹立した感染性分子クローンは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を提供するものと期待される。

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。これは感染者体内での 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ことに由来する。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、また樹立の効率をさらに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。本年度は昨年度来樹立してきた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の薬剤耐性 Phenotype を決定し、その耐性度を Genotype と比較することにより、その相関をクローンレベルで解析することを試みた。

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 CRF01_AE 組換体ウイルスである。

全ゲノム配列を決定した感染性分子クローンを 293FT 細胞へ Transfect し、2日後に培養上澄を得た。そのウイルス力価を MAGIC-5A 細胞で測定し、先に報告したように一定量の SEAP 発現量を得るように調整したウイルスを逆転写阻害剤あるいはプロテアーゼ阻害剤と共に MAGIC-5/SEAP 細胞株と2日間培養し、プロテアーゼ阻害剤の場合はさらにその増殖したウイルスを含む培養上澄を新たな MAGIC-5/SEAP 細胞株へ接種し、Naïve ウイルスとの IC50 値を除することにより耐性度を求めた。

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た。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った。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、守秘義務を守った。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

昨年度に樹立した感染性分子クローンで MAGIC-5/SEAP 細胞による迅速 Phenotype 薬剤耐性試験の成績を一覧表に示す。

患者 NH2000-0001 の4時点で分離したウイルスから樹立したクローンの薬剤耐性度は Genotype については Stanford 大学の Algorism を参考にした。全ての時期のクローンは AZT, ABC 及び d4T に対しては高度耐性の解釈であったが、Phenotype では AZT と ABC に関しては夫々数百倍以上、十数倍の耐性度を示し良く相関しているが、d4T に関してはクローン毎に様々な耐性度が認められ、乖離が認められた。一方 3TC に関しては Genotype では低いレベルの耐性度という解釈であったが、Phenotype では中度耐性域に属し、試験薬剤域を超える耐性度を示すクローンも認められた。

次にプロテアーゼ阻害剤の薬剤耐性プロファイルに関しては APV の場合に Genotype と Phenotype に顕著な乖離が認められた。即ち Genotype では Naïve な感受性ウイルスと解釈されたクローンが十倍以上の耐性度を Phenotype で検出した。NFV の場合も Genotype では中等度耐性と判断された初期分離ウイルス由来のクローンの多くは Phenotype でも同様な耐性度を示したが、後期分離ウイルス由来のクローンでは Genotype では変わらず中等度耐性と判断されるものの、Phenotype では殆どのクローンが3倍以下の耐性度を示すのみであった。同様な傾向は弱いながら IDV でも認められた。

次に患者 NH19-203 の4時点で分離したウイルス由来クローンで Phenotype 薬剤耐性度を測定できたクローンは限定されていた。これは多くの樹立クローンが MAGIC-5A (CD4 発現を MAGIC-5/SEAP 細胞より増強している) では増殖するのに対して MAGIC-5/SEAP 細胞では測定に供するだけの増殖を認められなかったことか

ら今回の検討から除いたものである。測定できたクローンの Genotype と Phenotype の耐性度比較から、この患者由来のウイルスは先の患者由来ウイルスに比較して検査した多くの薬剤に対して高度耐性を示していた。そのなかでも其の耐性度は DR5032 ウイルス由来クローンの AZT において、DR0492 ウイルスの d4T に及び APV における耐性度に Genotype と Phenotype 間に乖離が認められることが判明した。

D. 考察

本年度は、昨年度に 2 名の本邦感染者から 4 時点で分離した薬剤耐性 CRF01_AE 組換え体ウイルスから Half & Half Strategy により「HIV trapping System」で樹立し、その全ゲノム塩基配列を決定した 93 クローンに及ぶ感染性分子クローンの Phenotype 薬剤耐性プロファイルを解析し、Genotype から推測される耐性プロファイルと比較した。

これらの比較検討により明らかになったことは以下の通りである。Genotype では当然ながら Naïve ウイルスとの比較でその耐性度が数値化できないが、Phenotype では同じ中等度耐性を示すクローンでも高度耐性により近い領域に属するのか、低い領域に属するのか判明し、近い将来、どのように耐性度が変動しうるか予測しうることである。今回の感染性分子クローンレベルでの Genotype と Phenotype の薬剤耐性プロファイルの比較検討により Genotype で一律に高度耐性と判定されても、その Phenotype はクローン毎に様々であり、夫々の薬剤についてその耐性度に乖離があるクローンが認められた。この成績は、HIV-1 の薬剤耐性獲得機序が単に pol 領域の変異のみにて獲得されるものではなく、例えば env 領域の変化により、より標的細胞への感染効率が上がるウイルスに進化するなど、それに付随する他の領域

におけるウイルスゲノムの変異が積重なって Phenotype として表現され得る可能性を示している。このような作業仮説をクローンレベルで解析するのに、本研究で樹立した同一患者から異なる時期に分離したウイルスから樹立した多数の感染性分子クローンは貴重な分子基盤を提供し得るものと期待される。

一方本年度の検討から、新たな問題点が生じたことも指摘される。即ち HIV 感染価測定細胞の臨床株ウイルスに対する感受性の差異に由来する問題である。感染性分子クローンを樹立する際に、患者ウイルスを感染させ Provirus の鋳型を調整し、幾つかの過程で、その感染性のチェックに用いている MAGIC-5A 細胞株は、親細胞株 MAGIC-5 にウイルス分離効率を高める為 CD4 発現をさらに高めている。臨床分離株の多くは実験室株よりも、その感染成立における CD4 分子依存性が高いと報告されている。今回の 1 名の患者ウイルスから樹立した感染性分子クローンの多くが MAGIC-5/SEAP 細胞での増殖が MAGIC-5A に比較して劣ることは、この現象と関連している可能性があり、ウイルスクローンの CD4 依存性を解析する必要がある。薬剤耐性 Phenotype 測定に使用する MAGIC-5/SEAP 細胞株の CD4 発現は、元の親株 MAGI 細胞のままであることから、長い継代により CD4 発現が親株 MAGI と同様低下するのかもしれない。このことは、臨床分離ウイルスは実験室株に比較して、より CD4 分子依存性が高いと言われていることとも符合する。これらの成績は Phenotype Assay に用いる MAGIC-5/SEAP 細胞にさらに CD4 発現ベクターの組込みにより、その CD4 発現を高めることが必要であることが考えられる。

しかしながら今回の研究で、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つ

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、Genotypeでは見えてこない耐性がPhenotypeで明らかになったクローンが多数あることが判明した。この成績は、これら全ゲノムが患者ウイルス由来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。

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さらに進め、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と考えられる。またさらに多くの患者の時系列にそった分離ウイルスにおいて感染性分子クローンの樹立と解析を行い、CRF01_AE組換体のみならず、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る必要がある。

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ので、本樹立

法は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と考えられた。

E. 結論

同一患者由来ウイルスの多数の感染性分子クローンを用いた Genotype と Phenotype 薬剤耐性プロファイルを比較したところ、クローンレベルで薬剤耐性プロファイルに乖離を認めた。

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

M. A. Rodriguez, Y. Chen, J. K. Craig, 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* 345: 328 - 336, 2006..

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

該当なし。

Comparison of Drug Resistance Profile between Genotype and Phenotype

Drug Spectrum			NRTI						PI												
Patient Code	Drug		AZT		d4T		3TC		ABC		IDV		NFV		SQV		APV		Drug		
	DR	Clone no.	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	Gono	Phono	DR	Clone no.	
NH2000-001	DR1741	2	>350	6.3	29.4	17.4	29.9	7.9	3.9	30.9	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	DR1741	2	
		9	>410	5.7	28.3	14.9	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	DR1741	9
		18	342	4.8	20.6	14.5	34.6	4.9	30.8	2.1	30.8	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	DR1741	18
		22	>353	4.1	24.8	15.2	67.9	12.5	67.9	7.6	20.6	67.9	67.9	67.9	67.9	67.9	67.9	67.9	67.9	DR1741	22
		31	>330	4.2	23.6	16.8	23.3	10.9	23.3	10.9	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	DR1741	31
		44	191	0.8	22	11.3	19.9	19.9	19.9	2.4	1.8	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9	DR1741	44
		46	203	3.9	20.5	15.5	15.9	5.9	15.9	5.9	11.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	15.9	DR1741	46
		47	241	4	18.7	17.7	21.3	14.3	14.3	1.4	1.4	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	DR1741	47
		2	463	5.6	34.9	12.9	33.8	0.4	33.8	0.4	1.3	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	DR1741	2
		16	>430	6.8	20.4	15.8	0.5	0.5	0.5	0.7	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	DR1741	16
		21	>398	6.9	>30.0	18.9	7.8	2.9	7.8	2.9	2.1	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	DR1741	21
		47	>410	5.7	27	16.9	0.1	0.1	0.1	0.4	0.02	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	DR1741	47
		51	>405	7.1	25.9	14.3	0.9	0.9	0.9	1	0.3	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	DR1741	51
		38	421	4.3	9.2	16.7	0.9	0.8	0.8	0.8	1.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	DR1741	38
		40	301	5.6	8	14.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	DR1741	40
		57	221	0.7	20.4	15.9	6.1	1.1	6.1	1.1	0.5	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	DR1741	57
75	>390	9.4	>30.0	20.6	5.5	2.8	5.5	2.8	7.8	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	DR2594	75		
86	302	3.3	15	19.7	2.8	1.3	2.8	1.3	4.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	DR2594	86		
88	490	3.4	20	15.1	1.7	0.2	1.7	0.2	1.6	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	DR2594	88		
89	>376	3.9	10	18.5	1.2	1.1	1.2	1.1	5.5	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	DR2594	89		
12	>405	5.9	11.3	13.1	1.3	1.3	1.3	1.4	3.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	DR3730	12		
15	402	4.3	17.3	10.6	0.9	0.9	0.9	2.2	1.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	DR3730	15		
NH19-203	DR0492	7	>376	5.3	9.8	7.8	48.7	20.1	88.9	20.1	48.7	48.7	48.7	48.7	48.7	48.7	48.7	48.7	DR0492	7	
		32	>398	5.5	11.3	7.1	35.4	16.4	41.4	16.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	DR0492	32	
		5	384	8.8	10.5	11.3	38.8	19.8	32.6	19.8	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	DR0492	5	
		7	400	7.9	9.9	12.9	59.9	20.5	20.1	20.5	20.1	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	DR0492	7	
		15	>456	7.9	12.3	16.8	48.8	28.2	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	DR5032	15	
		18	387	8.1	9.6	20.1	38.3	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8	DR5032	18
		23	389	7.6	18.9	12.2	41.9	18.9	17.9	18.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9	DR5032	23
		24	403	6.3	15.6	15.2	25.6	16.6	22.1	16.6	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	DR5032	24

by Stanford Database

by Phenotype

	High-level resistance
	Intermediate resistance
	Low-level resistance
	Potential low-level resistance
	Susceptible

	> 100 fold resistance
	10.0 ~99.9 fold resistance
	5.1 ~9.9 fold resistance
	< 5.0 fold resistance

HIV 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

協力研究者 佐藤裕徳（国立感染症研究所ゲノム解析センター）・西澤雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター）・Walid Heneine（米国 CDC）

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、まず酵素学的な HIV-1 薬剤耐性検査法を確立し、次に高感度な薬剤耐性遺伝子定量法確立を目指す。今年度は、以下の知見を得た。

- ① 昨年度までに開発した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法は、人為的変異 HIV-RT の AZT-TP と 3TC-TP 耐性に加えて d4T-TP 耐性が定量的に測定可能である。
- ② 本検査による 3TC-TP の酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の相関が示唆された。
- ③ 超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した結果、血漿中全ウイルス中に 0.15% 以上存在する耐性遺伝子(K103N または M184V)であれば検出される可能性が示唆された。

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、まず酵素学的な HIV-1 薬剤耐性検査法を確立し、次に高感度な薬剤耐性遺伝子定量法確立を目指す。

B. 研究方法

昨年度までに開発した酵素学的 HIV-1 薬剤耐性検査法では d4T-TP 耐性測定可能かどうか、確かな陽性検体がなかったため明らかにできていなかった。今年度は、生物学的にも d4T-TP 耐性が確認されている K65R 株を共同研究者から入手し測定した。昨年度からの課題であった、酵素学的薬剤感受性と遺伝子学的薬剤感受性の相関を調べるために、昨年度明らかになった 3TC 軽度耐性（7.3～11.8 倍耐性）症例 3 例についての治療歴を共同研究者に問い合わせた。軽度耐性例の遺伝子学的薬剤耐性は、既存の方法は定性試験のため、詳しい相関について検討ができない。その弱点を補うべく、超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した。そのために、まず既報の手法の再

現を試みるべく K103N 遺伝子を検出するための系を、続いて M184V 遺伝子検出系を作成した。

C. 研究結果

1. 昨年度までに開発した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法で確認できなかった d4T-TP 耐性が確認できるようになった。（図 1）
2. 本検査により 3TC 軽度耐性と判定された 3 症例は未治療例であったことから、3TC-TP の酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の相関が示唆された。
3. 超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した結果、予備実験において、既報と同等以上の back ground を確認した（0.0015%）。（図 2）さらに、血漿中全ウイルス中に 0.15% 以上存在する耐性遺伝子（K103N または M184V）であれば検出される可能性が示唆された。

D. 考察

昨年度までの AZT-TP と 3TC-TP 耐性に加えて d4T-TP 耐性を検出する新規試験法として、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る事が可能である。

今年度、測定数は少ないが、3TC-TPの酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の相関が示唆された事は、臨床応用をうらなう上で重要な点である。一般に3TC耐性遺伝子は出現しやすく、遺伝子学的にも検出しやすい。一方で、遺伝子学的耐性が確認されても、ウイルス生物学的にどの程度の耐性なのかはPhenotype Assayの結果を待たねば分からない。既報のPhenotype Assayは最短でも1週間程度の時間がかかる。本法は前述通り半日で結果が出るため、定量的耐性度の結果が感染者に迅速にフィードバックできる。

今年度は、酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の相関がさらに詳しく検討できるように、超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した。これまでの結果では、0.15%~100%の範囲での定量的耐性度の解析が可能と見込まれている。先の酵素学的耐性と合わせて、HIV-RT薬剤感受性・耐性についての詳細な解析が可能になれば、それぞれの感染者に応じたきめの細かい治療法へとつながる事から、その意義は大きい。

そのためにも、今後は系の精度管理とともに測定数を増やして、酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の定量的相関を明らかにするべきである。

E. 結論

- ① 昨年度までに開発したHIV-RT薬剤感受性迅速試験法は、人為的変異HIV-RTのAZT-TPと3TC-TP耐性に加えてd4T-TP耐性が定量的に測定可能である。
- ② 本検査による3TC-TPの酵素学的耐性と遺伝子学的耐性の相関が示唆された。
- ③ 超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法開発に着手した結果、血漿中全ウイルス中に0.15%以上存在する耐性遺伝子(K103NまたはM184V)であれば検出される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

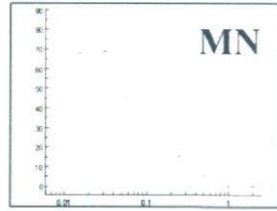
1. 論文発表

- 1) Dewan MZ, Terunuma H, Toi M, Tanaka Y, Katano H, Deng X, Abe H, Nakasone T, Mori N, Sata T, Yamamoto N. Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.* 2006 97:1381-7.
- 2) Ono S, Kurotaki T, Nakasone T, Honda M, Boon-Long J, Sawanpanyalert P, Kimura K. Cost-effectiveness analysis of antiretroviral drug treatment and HIV-1 vaccination in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2006 59:168-73.
- 3) Someya K, Ami Y, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Horibata S, Xin KQ, Yamamoto H, Okuda K, Yamamoto N, Honda M. Induction of positive cellular and humoral immune responses by a prime-boost vaccine encoded with simian immunodeficiency virus gag/pol. *J Immunol.* 2006. 176:1784-1795.
- 4) Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*, 80, 5563-5570, 2006.
- 5) Motohara M, Ibuki K, Miyake A, Fukazawa Y, Inaba K, Suzuki H, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T. Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes & Infection*, 8, 1539-1549, 2006.
- 6) Motohara M, Ibuki K, Miyake A, Fukazawa Y, Inaba K, Suzuki H, Masuda K, Minato N,

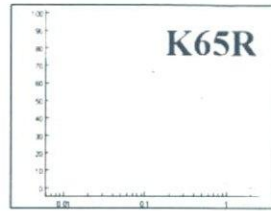
- Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T. Impaired T-cell differentiation in the thymus at the early stages of acute pathogenic chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) infection in contrast to less pathogenic SHIV infection. *Microbes & Infection*, 8, 1539-1549, 2006.
- 7) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Motohara M, Saito N, Nakasone T, Honda M, Watanabe T, Miura T, Hayami M. Rapid dissemination of a pathogenic simian/human immunodeficiency virus to systemic organs and active replication in lymphoid tissues following intrarectal infection. *Journal of General Virology*, 87, 1311-1320, 2006.
- 8) 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. 学会発表
- 1) Nakasone T. HIV-1 isolating system and drug-resistant HIV-1 surveillance system in Japan. 中国科学院武漢ウイルス研究所研究交流集会シンポジウム (3/23, 2006, 武漢、中国)
- 2) Nakasone T. Kanekiyo M, Yoshino N, Ami Y, Yamamoto N. Cell-Associated SHIV Infection in *Cynomolgus* Monkeys. 24th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, (Oct. 4-7, 2006, Atlanta, USA)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

RTI Susceptibility Test by Use of RTA²

d4T-TP



IC50=50nM



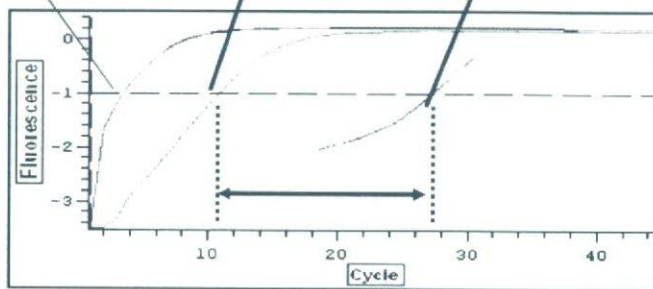
IC50=273nM

5.5倍の耐性

図1. AZT-TPと3TC-TPに加えてd4T-TP耐性も測定可能である

AS-PCR for K103N: Back ground of HIVmn

Total:Ct=3.479 K103:Ct=10.757 103N(AAC):Ct=27.095
 103N(AAT):Ct=27.164



$$2^{16.407} \text{ \& \ } 2^{16.338} = 86,896 \ \& \ 82,838$$

∴ Back ground=0.0012% & 0.0011%

図2. 超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法のバックグラウンドは0.0015%以下である

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 教授）

研究要旨 HAART 療法下で長期に亘り残存するウイルスと、その残存メカニズムの研究は、今後の治療戦略に重要な知見を与える。我々は長期にわたり HAART 療法下にウイルスの増殖が抑制されている 7 名の 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。この傾向は経時的に採取された血液サンプルを用いた解析にても同様の結果であった。一方、*BACH2* 遺伝子への HIV-1 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。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ており、HIV-1 proviral 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が明らかとなった。インテグレーションに関与する宿主因子の検索のため、*in vitro* モデルの構築を目指し、ウイルスが感染し染色体に組み込まれると GFP が発現するようにベクターを構築した。構築したベクターは Pt1 由来の T 細胞株、B 細胞株及び末梢血 CD4+細胞に VSV シュウドタイプウイルスを用いて導入し、インテグレーション部位を同定した。しかし、インテグレーション部位は用いた細胞によって異なり、*BACH2* 遺伝子への集積も見られなかった。感染から組み込みの *in vitro* モデルの困難さを示すと考えられた。

A. 研究目的

抗ウイルス薬の多剤併用療法 (HAART 療法) は、AIDS の発症率や死亡率を低下させたが、治療をもたらすのは困難と認識されるようになり、また薬剤耐性や長期毒性などの問題点も明らかとなってきた。有効な抗ウイルス療法下に残存するウイルスと、残存メカニズムの基礎研究は、HAART の最適化をはかる上で重要な知見を与えると同時に、よりよい治療法の開発のため必要不可欠である。我々は、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-1 感染症例のインテグレーション部位を解析し、そのうち 2 例に *BACH2* 遺伝子への HIV-1 の優先的なインテグレーションを観察した。本年度は、インテグレーションに関与する宿主因子の検索のため、*in vitro* モデルの構築を目指し、ウイルスが感染し染色体に組み込まれると GFP が発現するようにベクターを構築し様々な標的細胞を用いて、その組み込み部位を検討した。我々はまた多剤耐性変異を持つ症例

において、長期間ウイルス増殖を抑えた場合、耐性変異がどのように変化するか調べた。

B. 研究方法

(1) インテグレーションに関与する宿主因子の検索のため、*in vitro* モデルの構築を目指し、両側に HIV-LTR を持ち、宿主遺伝子に組み込まれると GFP が発現するベクター pTWL-GFP を構築し、VSV pseudotype virus として用いた。標的細胞としては、HTLV-I を用いて樹立した Pt1 由来の T 細胞株、EBV を用いて不死化した B 細胞株及び末梢血 CD4+T 細胞を用いた。標的細胞に VSV シュウドタイプ法を用いて導入し、2 日培養後 GFP の発現を確認して、インテグレーション部位を同定した。(2) HIV-1 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、時系列にそってインテグレーション部位を解析

した。(3) HIV-1 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-1 が再び増殖できるかどうかを調べた。(5) 長期間 HAART が有効な症例についてプロウイルス DNA 量をリアルタイム PCR で測定するとともに一部の症例では、エンベロップ並びに RT と PR のシーケンスを決定した。

(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。

C. 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。一方、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。これらのことは、HIV-1 のプロウイルスとしての残存と組み込み部位には関連がないことを示唆する。

これらのデータを集積する中から、7 人中 2 人の症例に関して BACH2 遺伝子に HIV-1 の組み込み部位の集積が見られることがわかった。そのうちの 1 症例において特にその割合が高かった (31%)。HIV-1 の組み込み部位の集積は

1998 年の HAART の開始から現在に至るまで 5 ポイントの血液サンプルでほぼ同頻度で検出された。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た。これは、BACH2 遺伝子以外の遺伝子にもみられ、また、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った。これらのデータは 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すと考えられる。

HIV が組み込まれている遺伝子が 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。インテグレーションに関与する宿主因子の検索のため、in vitro モデルの構築を目指し、ウイルスが感染し染色体に組み込まれると GFP が発現するようにベクターを構築し、Pt1 由来の T 細胞株、B 細胞株及び末梢血 CD4+ 細胞に VSV シュウドタイプウイルスを用いて導入し、インテグレーション部位を同定した。しかし、インテグレーション部位は用いた細胞によって異なり、BACH2 遺伝子への集積も見られなかった。

我々は耐性獲得後長期間サルベージで用いている HAART が有効な症例の経過を見ている。本症例についてプロウイルスの耐性変異を経時的に調べたところ、経過が長くなるに連れ耐性度がむしろ低くなる傾向がみられた。

D. 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 HIV-1 組み込み部位を解析した。その結果、多くの残存している HIV は resting