

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かった。

4) NL ウイルスの長期培養: NL4-3 を MT-2 細胞で長期培養 (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。NL101 では 54 個であった。同様に PM1 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、変異の著しい偏りがみられた。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、他の細胞では必ずしも正に影響しなかった (図 4)。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

臨床分離株の RT 領域に d4T に対する耐性変異が同定されなかったこと、そして RT 領域の組換えウイルスが d4T に低い耐性しか示さなかったことから、現在までに報告されていない変異、つまり従来の RT 活性中心近傍ではない変異が耐性を付与することが示唆された。今後、臨床分離 HIV 株の DNA 断片を組み換え範囲を広げてその責任耐性変異部位を同定する予定である。今回の低い耐性は、他の RT 阻害剤に対する耐性変異 (NAM: nucleoside associated mutation) によって付与されたものと考えられた。事実 RT 領域には AZT 関連変異である M41L、T215Y を含め、多数の耐性変

異が導入されていた。これら NAM の蓄積が d4T 高度耐性につながるという報告が多数あるが、今回の実験から否定的であることが明らかとなった。

これらの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。本年度樹立した NCK45 細胞は今までに報告されてきた細胞と異なりコレセプターを発現しておらず、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。事実、この方法を用いて世界で初めての CCR5 agonist を報告している (J Immunol, 2006)。一方、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。

新規薬剤として、核酸系 RT 阻害剤では EFdA、非核酸系 RT 阻害剤では thiazole 誘導体を同定することができた。EFdA 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、EFdAは有望な薬剤の1つであると考えられた。

一方、非核酸系RT阻害剤である 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-1 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。

NL4-3や101を長期間培養することで50以上の変異が導入されていたが、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。現在までに行わ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容易に予想され、細胞によってRT反応効率が変化し複製速度に影響を及ぼす可能性もあり、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1種類の細胞で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きれないことも示唆する。この研究結果で確かなこととして標準 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培養細胞環境に適応し、多数のアミノ酸置換を有してしまうことが明らかとなった。一方でこれは in vitro 薬剤耐性誘導を行ったときに導入される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 (J.

Virology, 2005)。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

1. d4T 耐性機序に関してはさらなる検討が必要である。
2. 簡便で安定性の高い phenotype assay 系を NP-2 細胞にて樹立した。
3. 薬剤耐性 HIV に有効な核酸系 RT 阻害剤、EFdA と非核酸系 RT 阻害剤 thiazole 誘導体を開発した。
4. 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、in vitro 耐性誘導時の2次変異の同定に重要な情報を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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* 49:1506-1508, 2006.
4. Ohrai 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.
5. Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otake 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Sugiura Y. RNase S complex bearing arginine-rich peptide and anti-HIV activity. *J Mol Recognit* 18:169-174, 2005.
 9. Kitano K, Kohgo S, Yamada K, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohru H. Attempt to reduce cytotoxicity by synthesizing the L-enantiomer of 4'-C-ethynyl-2'-deoxypurine nucleosides as antiviral agents against HIV and HBV. *Antivir Chem Chemother* 14: 161-167, 2004.
 10. Kohgo S, Yamada K, Kitano K, Iwai Y, Sakata S, Ashida N, Hayakawa H, Nameki D, Kodama E, Matsuoka M, Mitsuya H, Ohru H. Design, efficient synthesis, and anti-HIV activity of 4'-C-cyano- and 4'-C-ethynyl-2'-deoxy purine nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 671-690, 2004.
 11. Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S. Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology* 327: 215-224, 2004.
 12. Masuda N, Yamamoto O, Fujii M, Ohgami T, Fujiyasu J, Kontani T, Moritomo A, Orita M, Kurihara H, Koga H, Nakahara H, Kageyama S, Ohta M, Inoue H, Hatta T, Suzuki H, Sudo K, Shimizu Y, Kodama E, Matsuoka M, Fujiwara M, Yokota T, Shigeta S, Baba M. Studies of nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Part 1: Design and synthesis of thiazolidenebenzenesulfonamides. *Bioorg Med Chem* 12:6171-6182, 2004.
 13. Hayakawa H, Kohgo S, Kitano K, Ashida N, Kodama E, Mitsuya H, Ohru H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1. *Antivir Chem Chemother* 15:169-187, 2004.

2. 学会発表

1. 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.
2. 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, Feb 22-25, 2005.

3. 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. Jul 1-5, 2005.

4. Kodama E. HIV-1 fusion inhibitor-resistance and development of the new inhibitors. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program. Recent Status and Future Prospect of Antiviral Chemotherapy. Nov 17-19, 2004.

G. 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

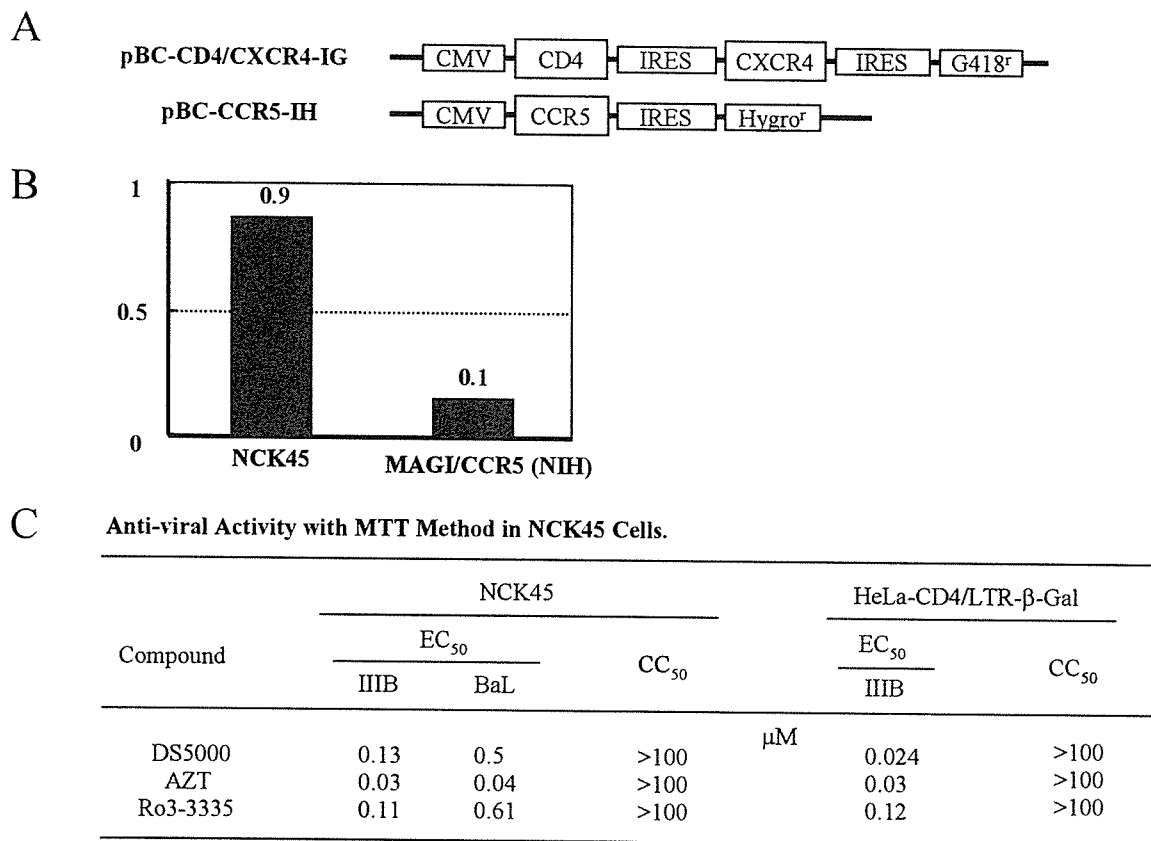


図 1. NCK45細胞を用いた抗HIV活性測定法の確立

A) NP-2細胞に導入したプラスミドの構成。CMVプロモーター下にCD4/CXCR4/G418耐性遺伝子、CCR5/Hygromycin耐性遺伝子をIRES配列を利用し、同時に発現できるようにした。B) 6ヶ月培養後のHIV-1感染性の推移。C) NCK45を用いたMTT法での抗HIV効果と従来のMAGI法の比較。DS5000: attachment inhibitor, AZT: RT inhibitor, Ro3-3335: Tat antagonist.

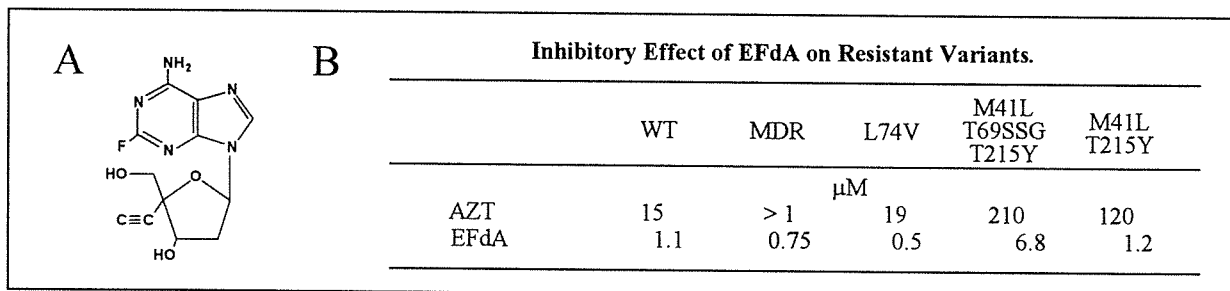


図 2. 4'-Ethinyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)の抗HIV活性

A) EFdAの構造式、B) EFdAの薬剤耐性HIVに対する効果。

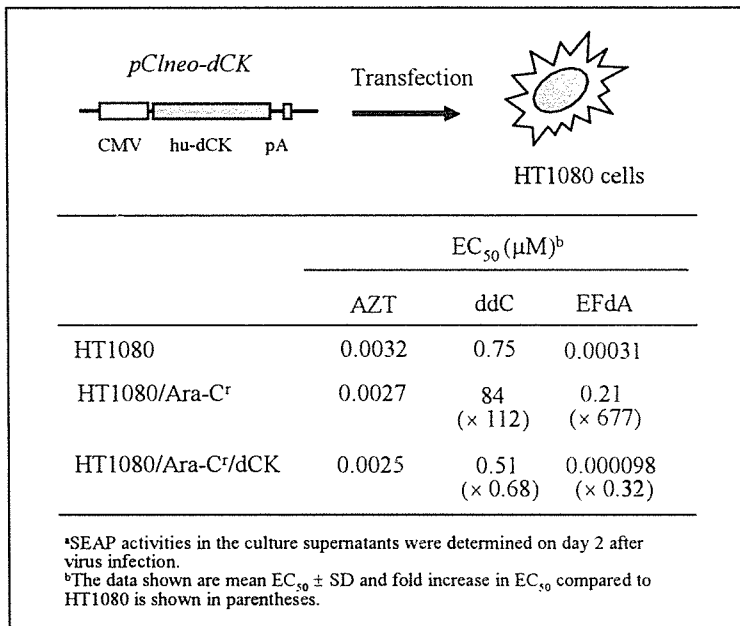


図3. Deoxycytidine kinase (dCK)の影響

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。

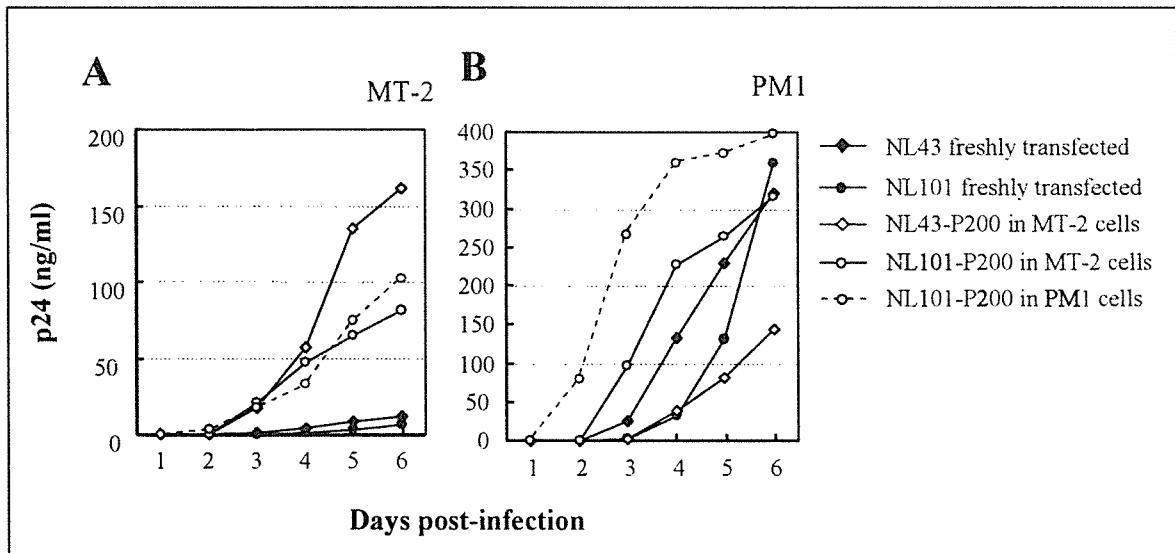


図4. 長期培養HIVの複製能の変化。

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 組換え体薬剤耐性ウイルスおよび Naïve ウイルスに適用し、本研究期間 3 年間で総計 1749 個の Full-genome clone のうち 50%以上の高率で 950 個の感染性分子クローンが得られ、その内 151 クローンの全ゲノム配列を決定した。2 名の治療患者から継時的に分離したウイルスから樹立した 93 個のクローンの Genotype 解析により pol 領域の薬剤耐性関連変異は時系列に沿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由来ウイルスの Phenotype 解析により Genotype と乖離した薬剤耐性プロファイルが幾つかの薬剤で判明した。高効率感染性分子クローン樹立法と Phenotype 測定による Genotype と Phenotype の統合した薬剤耐性試験法の可能性が示され、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。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。

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、長期に亙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

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と別の2名の患者から分離した subtype B の多剤耐性ウイルスを含めた。

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 に組み込み、しかる後に pol 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組み込む 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。

2名の継続的にウイルスを分離した薬剤耐性ウイルスから樹立し、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ともに 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、Naive 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し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

本研究の3年間に樹立した感染性分子クローンの成績を一覧表に示す。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 へ組み込み、LacZ 発現選択により組み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み込んだクローンを組み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、他の治療患者由来耐性ウイルスからは各2クローン、及び未治療 naïve ウイルスについては各1から2クローン総計151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傾向が認められた。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。この患者 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 を参考にしたところ、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 な感受性と解釈されたクローンは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すものもあったが、後期に分離した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は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。

もう一名の患者検体 NH2000-0001 についても genotype Profile については概略同様な傾向が認められた。次に患者 NH19-203 の4時点で分離したウイルスから樹立したクローンの 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 ウイルス由来のクローンの AZT に対する、DR0492 ウイルスの d4T に対する及び APV に対する耐性度に Genotype と Phenotype 間に乖離が認められることが判明した。

D. 考察

本研究期間で Half & Half Strategy による「HIV trapping System」のさらなる効率化が実現し、本邦感染者から分離した薬剤耐性あるいは naïve な CRF01_AE 組換え体及び subtype B ウイルスから 950 クローンに及ぶ感染性分子クローンが樹立された。これらのクローンのうち選定した 151 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 subtype B と CRF01_AE 組換え体の感染性クローンは夫々のウイルス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、我が国で感染者が多い subtype B と CRF01_AE 組換え体の感染性分子クローンを多数個樹立し、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、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 CRF12_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。

2 名の本邦感染者から継続的に分離した薬剤耐性 CRF01_AE 組換え体ウイルスから樹立し、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 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見しうることである。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。これらの成績は、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高まるウイルスに進化するなど、それに付随する他の領域の、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。

E. 結論

独自の感染性分子クローン樹立法をより効率的に進化させ、本邦感染者由来ウイルスから様々な耐性パターンをもつ多数の感染性分子クローンを樹立した。これらの感染性分子クローンの Phenotype プロファイル解析により Genotype と Phenotype を統合した、より詳細な薬剤耐性試験法開発の基盤が整備された。併せて邦人感染者に多い subtype B と CRF01_AE 組換え体の 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

Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T and Kojima A. Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4+ cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infect.* 2004 Apr;6(5):421-8.

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. 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

原 敬志、坂本優子、照沼 裕、本多三男、山本直樹、巽 正志 Zambia由来サブタイプ C 感染性分子クローンの樹立と解析。第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21 日～23 日

木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田毅、佐多徹太郎、巽 正志 Ghana 由来 HIV-1 感染性分子クローンの樹立と解析。第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21 日～23 日

原 敬志、坂本優子、照沼 裕、本多三男、山本直樹、巽 正志 アフリカ由来 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

木ノ本正信、徳永研三、坂本優子、生田和良、倉田毅、佐多徹太郎、巽 正志 HIV Trapping System による Ghana で流行する HIV-1 感染性分子クローンの樹立。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽 正志、星野洪郎 GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 株の感染を検出する細胞株の作製。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

富田康浩、Pumpradit W, Wichukchinda N, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, 草川 茂、武部 豊、巽 正志、田中真理、横山 勝、有吉紅也、佐藤裕徳 HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス株 NH2 に固有の抗体回避機構。第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004 年 12 月 9 日～11 日

日
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

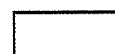
Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif
in a subtype-dependent manner^{2nd} Dominique
Dormont International Conference on "Host
pathogen interactions in chronic infections"
Paris Dec 1 - 3, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
該当なし。

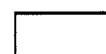
Infectious Molecular Clones from Drug-resistant or Naïve Virus

As of '06 12. 14

Subtype/CRF	Patient code	Virus code	Number of full-length clones	MAGIC-5A positive clones		Number of sequenced clones
				Number	(%)	
Subtype B	NH0801-076	DR1348	36	14	38.9	2
		DR2510	47	25	53.2	2
	NH0006-247	DR2508	47	45	95.7	2
	NH0006-236	DR3884	59	57	96.6	2
	DR6073	DR6073	18	8	44.4	1
	DR6075	DR6075	50	23	46.0	2
	DR6089	DR6089	48	4	8.3	2
	NH2047-1519600	DR6538	41	9	22.0	1
	NH2047-1707600	DR6737	92	54	58.7	2
	NH0020-520	DR7060	62	31	50.0	2
NH0305-038	DR7065	47	7	14.9	2	
Subtype A	UG037	92UG037	10	5	50.0	2
	RW008	92RW008	16	2	12.5	2
	RW025	92RW025	47	32	68.1	2
	RW037	93RW037	46	13	28.3	2
Subtype C	NH305-004	DR5782	39	30	76.9	2
Subtype G	NJ-03-175	03GH175	31	30	96.8	3
CRF01_AE	NH2000-0001	DR1741	26	17	65.4	12
		DR2594	87	32	36.8	10
		DR1873	62	57	91.9	12
		DR3730	68	52	76.5	12
	NH19-203	DR0492	70	36	51.4	12
		DR1236	145	42	29.0	11
		DR2192	83	29	34.9	14
		DR5032	18	10	55.6	10
	NH2047-1708444	DR6824	10	5	50.0	2
	TH051	93TH051	24	3	12.5	1
	TH054	93TH054	24	1	4.2	1
	TH057	93TH057	24	5	20.8	2
	TH060	93TH060	24	7	29.2	1
	TH062	93TH062	61	37	60.7	1
TH065	93TH065	37	13	35.1	1	
CRF02_AG	NJ-03-182	03GH182	36	36	100.0	2
	NJ-03-184	03GH184	24	24	100.0	2
	NJ-03-197	03GH197	23	23	100.0	2
	NJ-03-181	03GH181	51	41	80.4	2
	NJ-03-189	03GH189	27	22	81.5	2
CRF02_AG/CRF06_cpx	NJ-03-195	03GH195	24	24	100.0	2
CRF06_cpx	NJ-03-173	03GH173	33	27	81.8	2
CRF12_BF	NH0801-0077	DR0769	32	18	56.3	2
Total	33	40	1749	950	54.3	157



Drug Resistant Virus



Naive Virus

「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、HIV-1 薬剤耐性動態把握のための超高感度な酵素学的及び遺伝子学的検査体制確立を目指した。その結果、以下の知見を得た。

- ① ウィルス粒子 1 個が内包する RT 活性を検出可能、すなわちウィルス 1 コピー相当を検出可能な超高感度 RT 活性測定法 (RTA²) を完成させた。本法の感度と測定範囲は、RT 活性で 0.000001～1.0 U/ml であった。
- ② 前記 RTA² を用いて酵素学的な RT 薬剤感受性テストを開発した。同テストにて人為的変異 HIV-RT の AZT-TP、d4T と 3TC-TP 耐性が測定可能であった。さらに、HIV-1 感染者血漿中の臨床 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。このうち軽度耐性 (7.3～11.8 倍耐性) であった症例は薬剤未投与例であったことから、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。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%)。さらに、血漿中全ウィルス中に 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。
- ④ 以上より、HIV-1 薬剤耐性動態把握のための超高感度な酵素学的及び遺伝子学的検査体制確立への展望が開けた。

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した。

B. 研究方法

酵素学的な薬剤耐性動態把握のために、まず超高感度 RT 活性測定法を開発した。本法では RT-PCR 法を応用した Amp-RT 法を改良し、Real-Time PCR 法 (TaqMan) を取り入れた Real-Time Amp-RT Assay: RTA² として発展させた。

次に、RT 薬剤感受性テスト開発のために、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 HIV_{mn}-RT を、変異株として人為的に変異させた 6 株を用いた。さらに CRF_01 由来合成 RT (2 種) も用いた。これらの HIV-RT と薬剤を用いて RTA² を応用した HIV-RT 薬剤感受性迅速試験法の開発を行った。その上で、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。

最後に、超高感度遺伝子学的薬剤耐性検査法の開発に着手した。まず既報の手法の再現を試みるべく K103N 遺伝子と M184V 遺伝子を検出するための予備実験を行った。本法では Allele-specific PCR (AS-PCR) 法を用いて微量の耐性遺伝子を高感度に定量する。

(倫理面への配慮)

ヒトの臨床検体 (血漿) を用いた検査であるため、国立感染症研究所・医学研究倫理審査委員会 (2001 年当時) の承認の元、臨床研究に関する倫

理指針に従って行った。

C. 研究結果

1. ウィルス粒子1個が内包するRT活性を検出可能、すなわちウィルス1コピー相当を検出可能な超高感度RT活性測定法(RTA²)を完成させた。本法の感度と測定範囲は、RT活性で0.000001~1.0 U/mlであった。
2. 前記RTA²を用いて酵素学的なRT薬剤感受性テストを開発した。同テストにて人為的変異HIV-RTのAZT-TP、d4Tと3TC-TP耐性が測定可能であった。さらに、HIV-1感染者血漿中の臨床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。このうち軽度耐性(7.3~11.8倍耐性)であった症例は薬剤未投与例であった。
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%)。さらに、血漿中全ウィルス中に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

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ィ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。

本法が薬剤耐性の有用な指標と成り得るか、genotypeやphenotypeとの相関関係の検討が必要である。しかしながら、今回、本法で軽度耐性と判定された症例のgenotypeは、既存の遺伝子学的検査法では非耐性か耐性かのいずれかの判定になることが予想される。すなわち、既存の遺伝子学的検査法によるgenotypingは定性試験であり、定量的試験法ではないという弱点が本法により間接的に明らかにされた。さらに今回、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、ウィ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。

本研究では、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。今後、高感度なこの2つの方法により、HIV-RTについての酵素学的薬剤耐性と遺伝子学的薬剤耐性の定量的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 ウィルス1コピー相当を検出可能な超高感度RT活性測定法(RTA²)を完成させた。
- ② 前記RTA²を用いて酵素学的なRT薬剤感受性テストを開発した。現時点ではHIV-RTのAZT-TP、d4Tと3TC-TP耐性が測定可能である。
- 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、K103NまたはM184V耐性遺伝子検出のめどがたった。
- ④ 以上より、HIV-1薬剤耐性動態把握のための超高感度な酵素学的及び遺伝子学的検査体制確立への展望が開けた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, and Honda M.

- Update on HIV/AIDS in Japan, 2003. Eds. Lu, Y., and Essex, M. HIV in Asia. Kluwer Academic Publishers. p72-78 2004.
- 2) Yamakami K, Honda M, Takei M, Ami Y, Nakasone T, Kitamura N, Nishinarita S, Sawada S, Horie T. Early bone marrow hematopoietic defect in simian/human immunodeficiency virus C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. *J Virol.* 2004;78:10906-10.
 - 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
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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) Motohara M, Suzuki H, Miyake A, Ibuki K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, and Miura T. Impaired T cell differentiation in thymus at early stage of SHIV-infected monkeys. The 3rd International Student Seminar. (Nov. 25, 2004, Kyoto)

- 2) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Honda M, Miura T and Hayami M. Early Virological Events in Various Organs of Adult and Newborn Macaques after Intrarectal Infection with Pathogenic SHIV. 22nd Annual Symposium on Non human Primate Models for AIDS (Nov. 3-6, 2004, Seattle, USA)
- 3) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Takahashi M, Suzuki H, Horiuchi R, Saitou N, Nakasone T, Honda M, Miura T, Takahashi H, and Hayami M. Analysis of gut-associated lymphoid tissues (GALT) at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. The XV International AIDS Conference, (Jul. 11-16, 2004, Bangkok, Thailand)
- 4) Miyake A, Ibuki K, Enose Y, Suzuki H, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Honda M, Miura T and Hayami M. Early virological events in various tissues of adult and newborn macaques after intrarectal infection with pathogenic SHIV. The XV International AIDS Conference, (Jul. 11-16, 2004, Bangkok, Thailand)
- 5) 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 第 356 回東北医学会例会シンポジウム 2004年11月26日 仙台
- 6) 仲宗根正, Walid Heneine、山本直樹：逆転写酵素活性高感度測定法 (Real-Time Amp-RT Assay) の開発 第 34 回日本免疫学会 (12/1-3, 2004, 札幌)
- 7) 仲宗根正、高松純樹、山本伸二、Walid Heneine、山本直樹：逆転写酵素活性高感度測定法 (Real-Time Amp-RT Assay) の開発 第 18 回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 8) 田中慎一、大場孝、阪井弘治、仲宗根正、小島直也、佐多徹太郎、山本直樹、石川晃一：各種アジュバントを用いた抗 HIV 抗体産生能の検討 第 18 回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 9) 横山勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄聰、北村勝彦、蜂谷敦子、岡慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根正、佐藤裕徳：計算科学の HIV-1 研究への適用に関する基礎研究 第 18 回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 10) 山上賢治、武井正美、網康至、仲宗根正、北村登、三田村巧、本多三男、澤田滋正：病原性 SHIV C2/1 感染カニクイサルにおける早期骨髄幹細胞コロニー形成の障害と病態進行への関連性 第 18 回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 11) Someya K, Matsuo K, Izumi Y, Ami Y, Nakasone T, Yamamoto N, Honda M. A novel recombinant vaccinia DIs is replication deficient and efficiently elicits virus-specific positive-immunity. 第 18 回日本エイズ学会 (12/9-11, 2004, 静岡)
- 12) 仲宗根正、高松純樹、杉浦互、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)
- 13) 元原麻貴子、伊吹謙太郎、三宅莊子、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)
- 14) 宇佐美修、肖鵬、斉藤弘樹、服部俊夫、三木祐、佐藤功、服部真一朗、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)
- 15) 徳永恵一、中山大介。三隅将吾、仲宗根正、向井鎌三郎、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)
- 16) 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)

- 17) 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

「HAART の最適化に関する臨床研究」

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

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、治癒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。よって、薬剤耐性変異や慢性毒性を克服し、長期にわたり HAART の有効性を得るためには、治療に用いられている薬剤の血中濃度と臨床効果や副作用・耐性変異を検討し、HAART の最適化を図ることが増々重要となってきた。また、HAART 療法下に残存するウイルスの性質と残存メカニズムの基礎研究は、よりよい治療法の開発のためには不可欠である。我々は、HAART 療法により長期にわたり良好なコントロールを得ている症例のなかからリトナビル（RTV）+サキナビル（SQV）の double protease inhibitor を用いている症例の SQV の血中濃度に注目し、最適な薬剤の量と組み合わせについて考察すると同時に、薬剤代謝に関与する遺伝子の解析を行った。プロテアーゼ阻害剤の排出に関与する MDR1 遺伝子について SNPs タイピングを行った結果、最も高値を示した症例と最も低値であった症例が WT の homo であり、hetero や Mutant の homo のものは平均的な値であった。我々はまた、HAART 療法下で長期に亘り残存するウイルスのインテグレーション部位を明らかにした。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。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。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 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。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すると考えられた。

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、治癒をもたらすのは困難であることと、様々な長期毒性が明らかとなったことから、いかにして副作用を抑えつつ長期間服薬を継続ができるかという段階となっている。そのためには、抗ウイルス薬の組み合わせと最適な薬剤量の研究が、新規薬剤の開発と同様にきわめて重要である。本研究では、治療に用いられている薬剤の血中濃度と臨床効果や副作用・耐性変異の検索結果により、HAART に用いられる薬剤の組み合わせや量の最適化を図ることを目標とする。そこで、長期にわたり良好なコントロールを得ている症例のなかからリトナビル（RTV）+サキナビル（SQV）の double protease inhibitor を用いている症例の SQV の血中濃度に注目し、最適な薬剤の量と組み合わせについて考察すると同時に、薬剤代謝に関与する遺伝子の解析を行った。また、EFV と LPV/r を併用した 3 症例における LPV の PK を検討した。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ともに、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 感染症例のインテグレーション部位を解析し、BACH2 遺伝子への HIV の優先的なインテグレーションを観察した。

B. 研究方法

(1) 症例 ; RTV(100 ~ 400mg, BID)+SQV(800 ~ 1000mg, BID)+RTIs で 5 年以上継続的に良好な治療効果（HIV-RNA が測定感度以下）が得られている症例を対象とした。耐性変異検査；患者末梢血単核球より DNA を分離し、nested-PCR にて逆転写酵素（RT）とプロテアーゼ（PR）部位耐性変異の有無を調べる。SQV の血中濃度測定； EDTA 加血より血漿を分離し（2 ポイント；服薬前及び薬剤服薬後 2 時間）（5 ポイント PK；服薬前及び薬剤服薬後 1, 2, 4, 8 時間）、HPLC にて SQV を定量した。また、それぞれの症例の genomic DNA を用い、薬剤耐性遺伝子（ABCB1 と ABCC4）の SNPs タイピングを行った。EFV と LPV/r の併用による治療でウイルス量が感度以下にならない症例の LPV の PK を、良好症例のそれと比較検討した。

(2) 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。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。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。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。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 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。

(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病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。また、遺伝子解析に関しても、倫理的・科学的妥当性は熊本大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析に係る倫理審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果

1) RTV+SQV+RTIs で継続的に 5 年以上良好な治療効果を得ている症例 11 例について検討した。いずれの症例も副作用は観察されなかった。また PR に耐性変異は見られていない。すなわち、RTV+SQV の組み合わせは上記の量で nRTI や NNRTI と併用した場合、SQV の有効濃度を保つことが可能で、長期にわたり良好な臨床効果が得られるだけでなく、副作用も少ないことが確認された。症例により、薬剤血中濃度に大きな差が見られていることから、これら 11 症例の多剤排出遺伝子の検索 (ABCB1 と ABCC4 の SNPs タイピング) を、東京大学医科学研究所の北村義浩先生との共同研究で開始した。詳細な検討にはさらなる情報の蓄積が必要と考えられるが、3 年以上継続して SQV を服薬している症例の平均のトラフ値と MDR1 遺伝子間で関係を見ると、最も SQV の平均トラフ値が高値を示した症例と最も低値であった症例が WT の homo (C/C) であり、hetero (C/T) や Mutant の homo (T/T) のものはそれらの中間の値であった。

2) HAART 療法にて、6 年以上 HIV-RNA < 50 copies/ml の 7 名の HIV-1 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 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。

D. 考察

投与量や体重が、さほど変わらないにも関わらず、SQV の血中濃度に約 10 倍の差がある症例があり、これまで報告されてきたプロテアーゼ阻害剤の代謝に関与するといわれる、多剤排出トランスポーターである MDR1 遺伝子 (ABCB1) の SNPs タイピングを東京大学医科学研究所の北村義浩先生と共同研究で行った。その結果、最も高値を示した症例と最も低値であった症例が WT の homo であり、hetero や Mut の homo のものは平均的な値であった。今後、血中濃度と細胞内濃度との関係に MDR1 遺伝子が関与