

平成19年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H19- エイズ- 一般- 001

**薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法
に関する研究**

総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

目 次

I. 総括研究報告書	1
佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
II. 分担研究報告書	5
計算科学の応用研究：HIV の免疫逃避と細胞指向性進化機構の解析 佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
柱 1. HIV の薬剤・免疫逃避機構研究	
HIV 多型的変異の薬剤耐性出現に対する影響	9
瀧永 博之 (国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター)	
治療薬変更を考慮したプロテアーゼ耐性変異パターン予測	13
遊佐 敬介 (熊本大学大学院・医学薬学研究部・感染防御学分野)	
ヒト免疫系の遺伝的多型を考慮した耐性変異パターン予測法の研究	17
上野 貴将 (熊本大学・エイズ学研究センター)	
CXCR4 阻害剤耐性 HIV-1 の誘導と解析	21
村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
Atazanavir と lopinavir 治療における耐性変異パターン予測法の研究	25
西澤 雅子 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
柱 2. HIV 感染・増殖機構の研究	
HIV-1 ゲノムの逆転写および組み込み過程の新規制御機構	29
増田 貴夫 (東京医科歯科大学大学院・免疫治療学分野)	
NF- κ B p65 に相互作用する新規蛋白 AKIP1 の同定と HIV 遺伝子発現の促進作用	33
岡本 尚 (名古屋市立大学大学院・医学研究科・細胞分子生物学)	
HIV-1 Vpr の機能解析と機能を標的にした創薬への取り組み	37
間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット)	
APOBEC3G の調節過程を標的とする新たな HIV 複製制御法の研究	41
高折 晃史 (京都大学大学院・医学研究科・血液・腫瘍内科学)	
HIV Gag-Pol 蛋白の細胞内輸送	45
森川 裕子 (北里大附生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)	
HIV Vif 機能の調節過程を標的とする新たな HIV 複製制御法の研究	51
足立 昭夫 (徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部)	

III. 協力研究報告書

HIV ゲノム二量体化と組換えに関する解析	55
櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野)	
HIV 脱殻過程を標的とする HIV 複製制御法の研究	59
三隅 将吾 (熊本大学大学院・医学薬学研究部・薬学生化学分野)	
薬剤耐性 HIV の制御方法における新規薬剤標的としての cyclin K の評価	63
駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
IV. 業績一覧 (2007)	71

I. 総括研究報告書

薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する研究

課題番号：H19- エイズ- 一般- 001

主任研究者：佐藤裕徳（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長）

分担研究者：瀧永博之（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 専門外来医
長）、遊佐敬介（熊本大学大学院医学薬学研究部 講師）、上野貴将（熊本大学エイズ学研究
センター 准教授）、村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 室長）、西澤雅子（国
立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学
総合研究科 准教授）、岡本尚（名古屋市立大学医学研究科 教授）、高折晃史（京都大学大
学院医学研究科 助教）、足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）、
間陽子（理化学研究所 前任研究員）、森川裕子（北里大学北里生命科学研究所 教授）

研究要旨：薬剤の選択圧下で活発に増殖するHIVは、変異によって薬剤感受性、増殖能、あるいは他の性質が変化した変異体である。これらの発生機序を理解すれば、より効果的な治療が可能となる。本研究では、3年計画で感染者試料中のHIVのゲノム情報を収集し、自然界の選択圧の中で、どのような変異が許容されるのかを解析する。計算科学を応用して、蛋白質の構造と機能の変化を解析するシステムをつくる。HIVの薬剤逃避、免疫逃避、感染・複製のしくみを分子、細胞、または個体レベルで調べる。本研究により、HIV感染症制御の鍵となるウイルスの複製過程、蛋白質構造、変異の情報が蓄積する。当該年度は、計算科学の有用性を示す結果を得た。HIVの薬剤逃避、免疫逃避、増殖の基礎情報を蓄積した。

1. 研究目的

本研究では、薬剤耐性 HIV の発生機序とその制御方法に関する基礎研究を行なう。薬剤耐性 HIV の発生は、4000 万人規模の感染者が影響を受ける世界共通の社会問題である。抗 HIV 治療の効果を確保するには、早急に対策に取り組む必要がある。

本研究では、新しい試みとして、ゲノム解析技術と計算科学を感染症研究に応用する。感染者の HIV の全ゲノム情報を蓄積する。HIV の薬剤逃避、免疫逃避、増殖の情報を蓄積する。自然界での選択圧の中で、どのような変異が許容されるのかが明らかになり、薬剤耐性 HIV の発生の鍵となる変異情報が蓄積する。HIV 制御の鍵となる増殖、構造、変異情報が蓄積する。

2. 研究方法

本研究では、新しい方法論を試みる。現行の薬剤耐性研究の手法（薬剤標的酵素の遺伝子断片の配列解析、分離ウイルスや組換えウイルスを用いた薬剤感受性試験）は、治療中の感染者で持続的に増殖するウイルスの特徴の一部を記述するに過ぎない。既知の耐性変異情報に基づく遺伝子断片の解析では、未知の変異の意義や他の性質変化

がわからない。培養細胞で馴化した分離ウイルスや人為的に作製した組換えウイルスは、本来、感染者のウイルスがもつ性質の一部を失っている可能性が高い。いずれの手法も、薬剤標的酵素の変化と連動するウイルス変化の解析ができない。感染者で持続的に増殖するウイルスの特徴を把握するには、新たな方法論を必要とする。

計算科学の感染症研究への適用：本研究では、患者材料から直接 HIV の全ゲノム情報を取得し、計算科学による配列、構造、機能の解析によって HIV の性質変化に関わる変異を予測し、薬剤耐性 HIV 発生の理解と制御に役立てる。

近年、ゲノム解析技術が急速に進歩し、迅速に塩基配列情報を集積することが可能になりつつある。また、生物とその構成分子の大容量データを解析する新しい方法論として、計算機を用いて情報を高速処理し分析するバイオインフォマティクスが急速に発展している。これらの方法を組み合わせれば、易変異性病原体のゲノム情報を大量に取得し、自然界での変異の実体と規則性を解析することが可能になる。

分担研究：HIV の薬剤逃避、免疫逃避、感

染・複製のしくみを分子、細胞、または個体レベルで調べる。得られる情報を、薬剤耐性 HIV 発生の理解と制御に役立てる。

研究の枠組み：計算科学とゲノム解析の研究は、主任研究者が担当する。ウイルス学研究は、11名の分担研究者と5名の協力研究者が担当する。2つの研究の柱を設定する。柱1では、薬剤耐性 HIV の発生機構、柱2では、HIV 感染・増殖機構を研究する。

(倫理面への配慮)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、必要に応じて関連機関の倫理審査会の審議を受け、提供者の承諾とプライバシーの保護に万全を期す。HLA などの検体提供者本人の遺伝子解析を含む研究は、倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、文書による同意を得た場合に限る。動物実験は、研究機関の倫理審査会の審議を受け、認証を得て行う。

3. 研究結果

平成19年度は、3年計画の初年度にあたる。主に研究の基盤整備と予備的解析を行なった。

(1) **計算科学の適用研究：**計算科学の応用と実験により、Env V3 の立体配置変化に基づく抗体中和逃避機序を見つけた。V3 の配置は V3 荷電の変化で変わる。ウイルスに CCR5 指向性を付与する機能をもつ V3 は抗体中和抵抗性の配置をとることがわかった (佐藤、協力研究者＝国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 横山勝、横浜市立大学 長縄聡)。

(2) **柱1の研究：**感染者血液から直接 HIV の全ゲノム情報を取得し、計算科学を応用して蛋白質の構造機能を解析し、変異ウイルスの特徴を明らかにするシステムをつくった (佐藤、協力研究者＝国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 本村和嗣、横山勝)。感染者血中に存在する HIV-1 変異集団のプロテアーゼの分子進化を解析できる培養細胞系をつくった (遊佐)。薬剤治療中に細胞生免疫応答が持続し、CTL 逃避ウイルスが選択される証拠を得た (上野)。EFV 耐性の誘導実験を行ない、新たな耐性変異候補を見つけた (瀧永)。感染者から

Atazanavir 耐性、lopinavir 耐性ウイルスを分離した (西澤)。HIV-1 の感染阻害剤耐性の誘導実験を行なう培養細胞系をつくった (村上)。

(3) **柱2の研究：**Vif, Gag 等の機能調節を解析し、レトロウイルスの種特異性発現の責任領域を規定することで、新たな HIV 感染サルモデルの開発基盤をつくった (足立)。HIV-1 インテグラーゼの制御機構を解析する培養細胞系をつくった (増田)。APOBEC3G の機能調節を解析し、リン酸化されると Vif 誘導性分解作用に抵抗性となることを見つけた (高折)。HIV-1 Gag の機能調節を解析し、Gag-Pol 前駆体の細胞内輸送と、Gag の成熟場所に関する新知見を得た (森川)。HIV-1 Vpr の機能調節を解析し、核移行制御に関する新知見を得た (間)。HIV-1 の転写調節を解析し、ウイルス増殖阻害剤候補をスクリーニングした (岡本)。

(4) **他の協力研究：**HIV-1 粒子の脱殻過程に Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 が関与することを見つけた (熊本大学医学薬学研究部 三隅将吾)。HIV-1 ゲノム組換え効率、ゲノム二量体化効率と相関することを定量的に示した (大阪大学微生物病研究所 櫻木淳一)。

4. 考察

薬剤耐性 HIV の問題は、行政、社会科学、臨床医学、基礎医学が一体となって対処する必要がある。本研究は、HIV の薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、抗 HIV 薬とワクチン開発等を実施する際の科学的基盤を提供する。

また、計算科学とゲノム解析技術を感染症研究に応用する新しい研究戦略の構築が期待される。ウイルス分離を経ずに自然界のウイルスの特徴と変化様式を知ること、薬剤逃避と持続的増殖のしくみを正しく理解する道が開ける。より有効な HIV 増殖制御法を開発できる。

今、HIV の薬剤耐性と増殖のしくみを研究するための新しい発想や方法論の構築が強く求められている。計算科学とゲノム科学の進展は著しく、様々な生命現象の解析に応用できる普遍性をもつ。感染症研究にも適用できるはずである。しかし、十分に

活用されているとは言えない。本研究の試みは、感染症研究に新たな方法論を確立していくうえで重要な意義を持つ。

佐藤らの計算科学の研究成果は、学術的意義と応用上の有用性が高い。HIV-1 の免疫逃避と R5 ウイルスの持続感染を理解する分子基盤を提供する。感染症研究に計算科学を適用する道を開いた。

足立らの種特異性機構の研究成果も、大きな意義をもつ。レトロウイルスの種特異性が生じるしくみの理解が格段に進んだ。必要だが困難であった HIV-1 感染サルモデル構築への道を開いた意義は大きい。

3年の研究期間で独自の新しい研究システムの構築を試みることは、他の分担研究者にも求められている。遊佐らの解析系は、治療変更後に生じる耐性変異を予測する実験系として興味深い。上野、潟永らは、ヒト免疫系の多型が耐性発現に及ぼす影響を解析する系の準備を進めている。佐藤、潟永らは、治療中の感染者の HIV ゲノム解析の準備を進めている。潟永、村上、西澤らは、薬剤耐性変異に関する貴重な情報の蓄積を続けている。

足立、増田、高折、岡本、森川、間、村上らのレトロウイルス増殖機構研究は、新たな HIV 増殖阻害剤開発の基盤を提供する。薬剤耐性 HIV の制御につながる。研究協力者（三隅、櫻木）の研究も同等の大きな意義をもつ。一方で、学術的意義をもつ。各々は、独自の視点と解析系をもつ。今後も、新しい発想や方法論に基づき地道な基礎知見を積み重ね、より高いレベルの学術研究に発展させていくことが強く求められている。

5. 自己評価

1) 達成度について

初年度は、計画通りに進んだ。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究の試みが軌道に乗れば、学術的意義は大きい。ウイルス学と計算科学をつなぐ境界領域研究として、国際的な先端性が

ある。柱1、2の研究は、学術的意義とともに社会的意義も大きい。HIV の薬剤耐性検査、疫学調査、薬剤治療、治療薬とワクチン開発等を実施するうえで必要不可欠な基礎ウイルス学情報を提供する。エイズ対策の科学的基盤を提供する。

3) 今後の展望について

初年度の成果を発展させる。計算科学の研究では、薬剤逃避、免疫逃避、HIV 感染、HIV 増殖等の分子機序の研究への応用を研究する（佐藤）。柱1では、治療中のウイルスゲノムの特徴（佐藤、潟永）、耐性ウイルスの遺伝子と生物活性の特徴（潟永、遊佐、村上、西澤）、ヒト免疫系の遺伝的多型が耐性獲得にあたる影響（上野、潟永）を解析する。柱2では、個体レベルでのレトロウイルスの感染・増殖の制御機構（足立、佐藤）、細胞レベルでの制御機構（増田、森川、間）、分子レベルでの制御機構（岡本、高折）を解析する。薬剤耐性 HIV の発生と持続的増殖のしくみを考察する。

最終年度は、主要な発見や仮説を検証し、統合する。ウイルス学情報と立体構造情報に立脚した新しい HIV 制御法（薬剤耐性ウイルスを含む）を提案する。

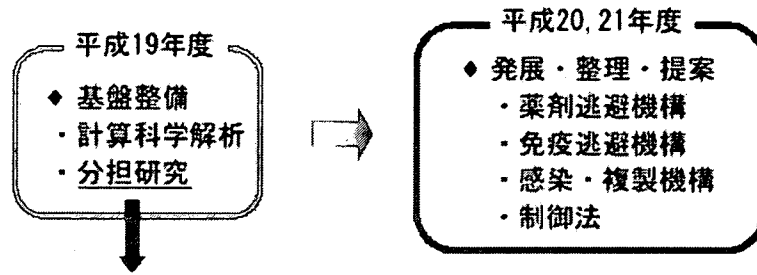
6. 結論

ゲノム解析技術と計算科学を応用して変異を解析する新しい研究方法の有用性を示す結果が蓄積した。HIV の免疫逃避、持続感染、薬剤逃避、増殖に関する新知見が蓄積した。残り2年間で、感染者の HIV の全ゲノム情報を蓄積する。引き続き、HIV の薬剤逃避、免疫逃避、増殖のしくみを研究する。自然界での選択圧の中で、どのような変異が許容されるのかを解析する。これにより、薬剤耐性 HIV の発生の鍵となる変異情報が蓄積する。HIV の制御の鍵となる増殖、構造、変異情報が蓄積する。

7. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

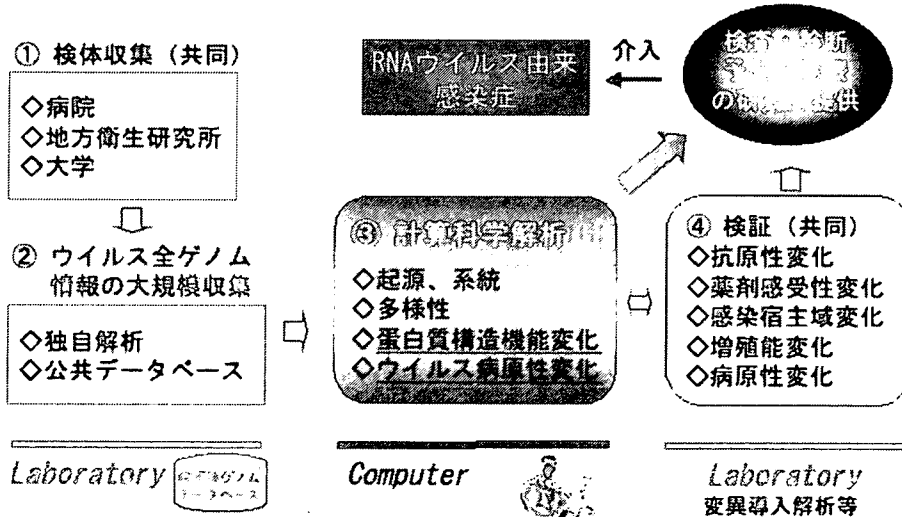
なし。

分担研究 概要



- ◆ 柱1. HIV薬剤耐性機構の解析 (6名)
 - ・ 細胞レベル: 耐性HIV誘導系でのHIVの変化 (村上、遊佐)
 - ・ 個体レベル: 治療中のHIVゲノムの特徴 (佐藤、湯永、西澤)
免疫逃避、薬剤逃避、増殖能の関係 (上野、湯永、佐藤)
- ◆ 柱2. HIV増殖機構の解析 (6名)
 - ・ 細胞レベル: HIV複製機構 (増田、間、岡本、高折、森川、足立)
* 研究協力者 (櫻木、三隅、駒野)
 - ・ 個体レベル: サルでのHIV増殖モデルの構築 (足立)

計算科学をHIV感染症研究に活用する 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター



患者や動物材料から直接ウイルスの全ゲノム情報を取得し、計算科学を応用して蛋白質の構造・機能と変化様式を解析する。自然界での新型ウイルス発生、伝播、持続感染、進化の理解が進む。科学的根拠をもとにした効果の高いウイルス制御が可能となる。

II. 分担研究報告書

計算科学の応用研究：HIVの免疫逃避と細胞指向性進化機構の解析

分担研究者 佐藤裕徳 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長
研究協力者 横山勝 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 研究官
長縄聡 横浜市立大学 公衆衛生学

研究要旨 HIVは、エンベロープ gp120 V3 領域の変異で細胞指向性を容易に変化させる。しかし、免疫の働く無症状期では CCR5 指向性ウイルスのみ観察される。計算科学解析と実験により、免疫逃避能に優れた HIV は特定の V3 構造をもつこと、その構造特性をもつと V3 立体配置が変化し、HIV は抗体中和抵抗性かつ CCR5 指向性になることがわかった。自然界で CCR5 指向性ウイルスが優勢となるのは、免疫淘汰の結果と推察される。

A. 研究目的

本分担研究では、計算科学を HIV 感染症研究に応用するための方法論を研究する。本年度は、HIV の免疫逃避と細胞指向性進化の解析に応用した。

B. 研究方法

図 1. に研究戦略を示す。公共データベース情報を用いた配列多様性解析と蛋白質の立体構造解析に計算科学を用いた。V3 の機能解析は実験を用いた。

(1) HIV-1 gp120 V3 の変異解析

V3 構造と多様性の関係を調べた。米国ロスアラモス研究所が提供する公共データベース (HIV_Sequence Database 2007年, 6月のデータ) から HIV -1 CRF01_AE V3 の塩基配列とアミノ酸配列を収集した。1 感染者から 1 配列を任意に抽出した (N= 1361)。これらの配列は、37 カ国で 1984-2005 (20 年) の間に報告された配列であった。V3 アミノ酸配列を荷電量の違いと N 結合型糖鎖付加部位 (NXT/S) の有無で分類した。それぞれの V3 グループの配列変化の生じやすさを、塩基配列の d_n/d_s 比 (非同義置換率/同義置換率)、Tajima's D 値、およびアミノ酸のエントロピー (Shannon エントロピー) を指標にして調べた。

$$H(i) = - \sum_{x_i} p(x_i) \log_2 p(x_i)$$

(2) HIV-1 gp120 V3 の機能解析

V3 構造と HIV の抗 V3 抗体感受性、およびコレセプター指向性の関係を調べた。HIV

-1 CRF01_AE 感染者で無症状期または AIDS 患者由来の V3 配列を、HIV-1 subtype B LAI 株の V3 と組換えた (N=30)。HIV-1 CRF01_AE 感染者 [N=20 ; Clinical stage, A1 (N=4), A2 (N=4), B3 (N=3), C2 (N=1), C3 (N=7), unknown (N=1)] から血漿を収集した。血漿中の V3 結合抗体価は、組換えウイルス V3 の中央に相当する合成ペプチド (19 アミノ酸残基) を用いて ELISA により測定した。血漿の中和力価は、MAGIC-5A 細胞 (国立感染症研、巽博士より分与) を用いて測定した。

(3) HIV-1 gp120 V3 の構造解析

Gp120 単量体/sCD4/CD4i 単抗体複合体の X 線結晶構造情報 (PDB ID 2B4C) をもとに、ホモロジーモデリング法により V3 組換え Gp120 単量体の分子モデルを構築した。sCD4 と CD4i 単抗体を除いた後、分子動力学法により安定な構造を探索することで、CD4 結合前の V3 の立体配置を求めた。分子動力学計算には、力場 parm99 と Amber8 を用いた。計算には MDGRAPE-3 を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究の中和実験では、HIV-1 感染者の血漿を用いた。血漿は、横浜市立大学付属病院に通院する HIV-1 感染者からインフォームドコンセントを得て収集した。

C. 研究結果

(1) V3 構造と出現頻度の関係 (図 2-1)

データベースに最も高頻度に出現した V3

配列は、鎖付加部位をもち、電荷が+3 の配列 (3b) であった。CCR5 指向性と関連する低荷電 V3 (2b, 3b, 4b) は、全体の約 70% 以上を占めた。

(2) V3 構造と多様性の関係 (図 2-2)

これら CCR5 指向性 V3 では、アミノ酸変化が抑制されていることが種々の配列解析の手法で確かめられた。一方、+5 以上の CXCR4 指向性 V3 では、活発な抗原変異が観察された。図では、エントロピー解析の結果のみを示す。Shannon エントロピーは情報科学であいまさを表す量で、より大きければより多様であることを意味する。

(3) V3 構造とウイルス中和感受性の関係 (図 2-3)

ほぼ全ての HIV-1 感染者血漿に、2b, 3b, 4b V3 配列を認識する高力価の結合抗体が存在した。しかし、2b, 3b, 4b V3 をもつ組換え HIV は、血漿で中和されなかった。一方、糖鎖付加部位が消失した V3、あるいは荷電量が +5 以上の V3 をもつ組換え HIV は、低力価の抗 V3 抗体を含む血漿で容易に中和された。

(4) V3 構造とウイルス中和感受性、ウイルス細胞指向性の関係 (図 2-4)

中和抵抗性 V3 をもつウイルスは、例外無く CCR5 指向性ウイルスであった。一方、全ての CCR5 指向性ウイルスが中和抵抗性ではなかった。CXCR4 指向性ウイルスは全て中和感受性であった。

(5) V3 構造と立体配置の関係 (図 2-4)

低荷電 CCR5 指向性 V3 と高荷電 CXCR4 指向性 V3 は、gp120 単量体上で大きく異なる立体配置をとることがわかった。ここでは、3b V3 と 7a V3 の分子動力学計算の結果を示す。3b V3 では、V3 は stem 付近から折れ曲がり、tip は $\beta 20$ - $\beta 21$ ループとは逆方向に伸びる構造をとった。この配置は、V3 base の D330 と R332、あるいは D330 と gp120 コアの R424 との間の水素結合で安定化されていた。これらのアミノ酸は、ロスアラモスデータベースに登録されている HIV-1 group M (A, B, C, CRF01_AE) gp120 配列で高度に保存されていた。しかし、高荷電 V3 (7a V3) ではこの相互作用は無く、V3 はコアから離れるように伸びていた。その結果、中和エピトープ領域である tip は、3b V3 と 7a V3 で約 35 Å 離れた配置で安定化した。

(5) その他のウイルスと宿主分子の立体構造解析 (図 3)

HIV-2 カプシド、CXCR4、カリシウイルスプロテアーゼ、インフルエンザ HA の分子構造をコンピューターで再現し、変異による構造変化や基質親和性変化を予測した。構築したシステムの信頼性を、実験結果との比較で検証した。構造変化、あるいは基質親和性を示す計算値は、実験で示されたウイルスの性質変化、あるいは基質親和性変化を良く説明した (大阪大学微生物学研究所の塩田博士ら、長崎大学熱帯医学研究所の久保博士ら、感染研ウイルス二部の武田博士らとの共同)。

D. 考察

V3 の変異性は、V3 自身の物理化学的性質 (荷電量と糖鎖付加) の影響を受ける。3b 等の低荷電 CCR5 指向性 V3 は低変異性で、7a 等の高荷電 CXCR4 指向性 V3 は高変異性であることがわかった。CCR5 指向性 V3 には抗原変異を促す免疫淘汰圧が作用していないと推測される。実際に、ウイルスは CCR5 指向性 V3 をもつと V3 結合抗体の中和に抵抗性となることを実験で示した。また、CCR5 指向性 V3 は CXCR4 指向性 V3 と異なる立体配置をとる、三量体 gp120 において中和エピトープの遮蔽をもたらす位置に配置するなどがわかった。自然界で CCR5 指向性ウイルスが優勢となるのは、免疫淘汰の結果と推察される。

一連の発見は、抗体中和逃避と持続感染機構の理解に役立つ。なぜ持続感染期に CCR5 指向性ウイルスのみが観察されるのかを説明する。現行の Env ワクチンは効果が期待できないことが予測される。感染者の抗体の中和能を増強する方法の開発に役立つ。

E. 結論

計算科学解析と実験により、HIV-1 の抗体中和逃避機序を見つけた。CCR5 指向性への変異で、V3 は抗体中和抵抗性の配置をとることがわかった。自然界で CCR5 指向性ウイルスが優勢となるのは、免疫淘汰の結果と推察される。

計算科学解析の信頼性を検証した。実験で示された結果と極めて良く一致した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi K, Tohya Y, Sato H, and Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J. Virol.* 81: 6798-6806, 2007.
- 2) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, and Shioda T. A single amino acid of Human immunodeficiency virus type 2 capsid determines susceptibility to cynomolgus monkey and human TRIM5 α restriction. *J. Virol.* 81: 7280-7285, 2007.
- 3) Kubo Y, Yokoyama M, Yoshiia H, Mitania C, Tominaga C, Tanaka Y, Sato H, and Yamamoto N. N-glycan-mediated protection of human cells from human immunodeficiency virus type 1 X4 virus infection and a viral mechanism to counteract the host defense system. *J. Gen. Virol.* 88:3139-3144, 2007.

2. 学会発表

- 1) 横山 勝、岡智一郎、山本真民、宮下佳奈、Hansman S. Grant、片山和彦、小川智子、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳：サポウイルスプロテアーゼ/ORF1ポリプロテイン複合体の構造解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、2007年10月、札幌。
- 2) Naganawa S, Yokoyama M, Kitamura K, and Sato H. Self-masking of HIV-1 envelope V3 variants for neutralization escape. The third Japan-Germany HIV/AIDS Symposium. November, 2007, Hiroshima.
- 3) 佐藤裕徳、横山勝、神田忠仁、早川 智、北村勝彦、長縄聡：HIV-1 CRF01_AE V3の変異解析。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30(水-金)、広島。
- 4) 長縄聡、早川 智、北村勝彦、佐藤裕徳：HIV-1 CRF01_AE V3の機能解析。第21回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30(水-金)、広島。
- 5) 横山勝、長縄聡、神田忠仁、佐藤裕徳：HIV-1 CRF01_AE V3の構造解析。第2

1回日本エイズ学会学術集会、2007年11月28日-30(水-金)、広島。

- 6) 横山 勝、岡智一郎、山本真民、宮下佳奈、Hansman S. Grant、片山和彦、小川智子、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳：サポウイルスプロテアーゼ/ORF1ポリプロテイン複合体の構造解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、2007年10月、札幌。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。) なし。

図3.V3構造、機能、立体配置の関係

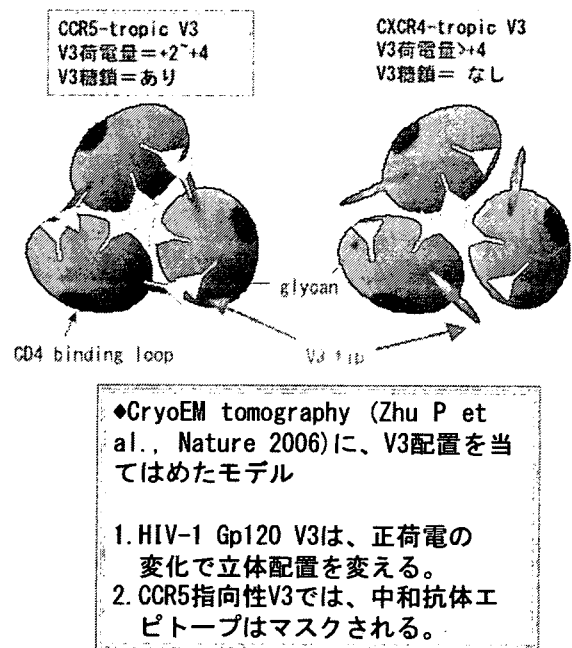


図4. 計算科学によるRNAウイルス複製機構研究支援の例(立体構造解析)

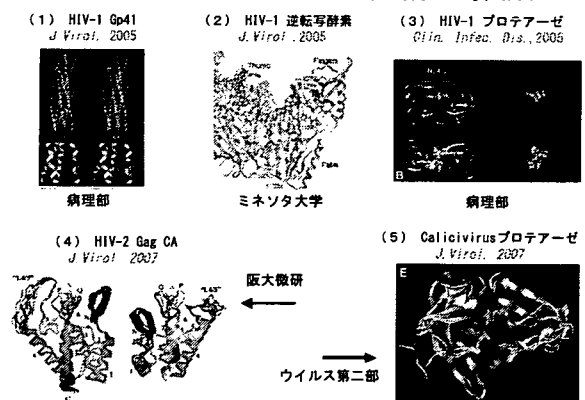


図1. 計算科学の応用例：V3構造と多様性、機能、立体配置の解析

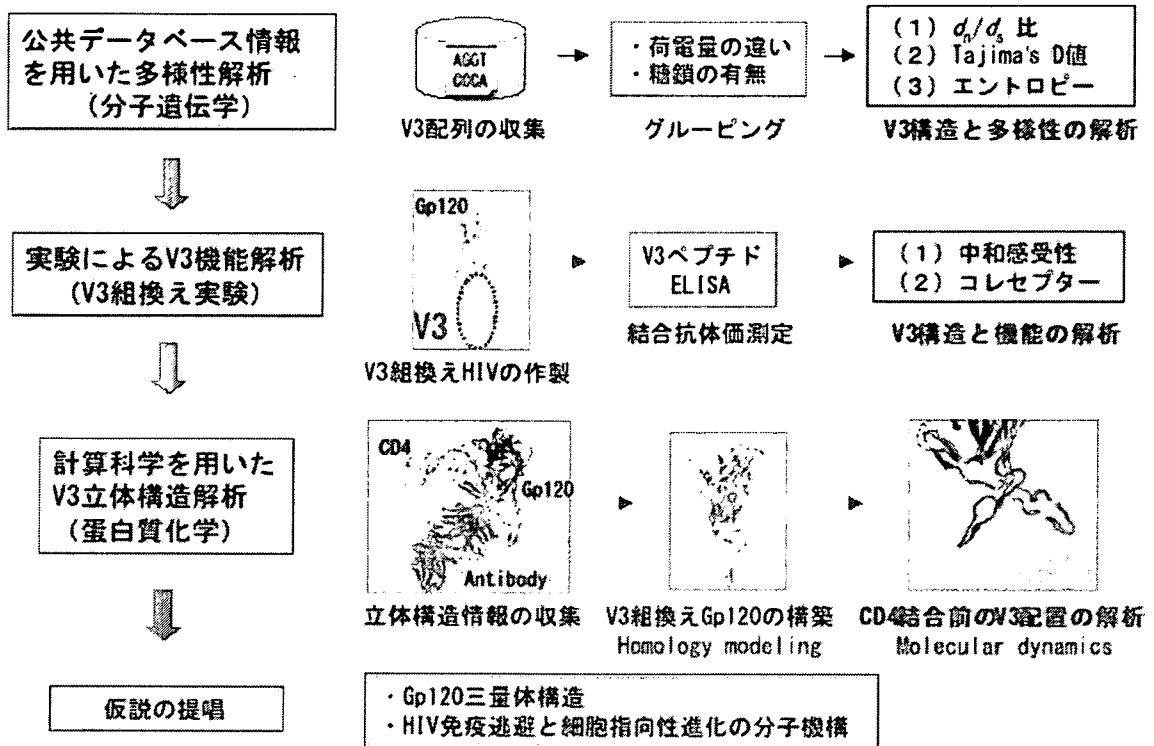
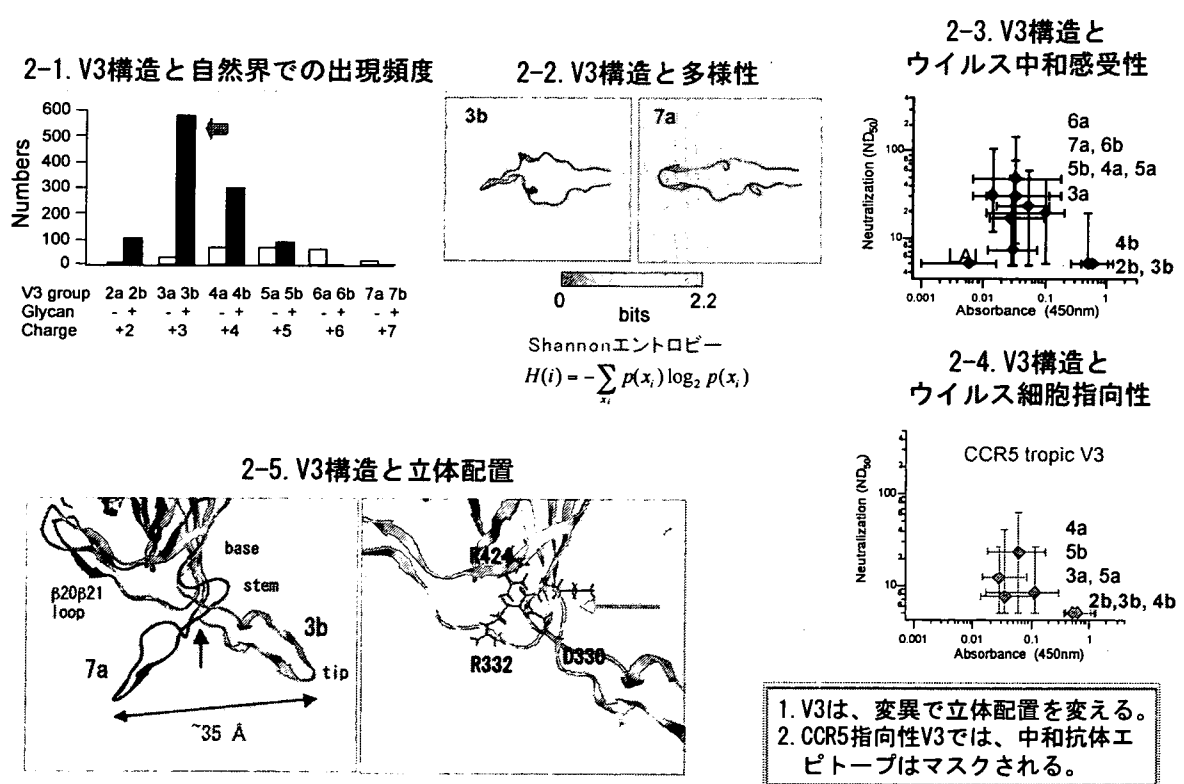


図2. 結果：CCR5 指向性への V3 変異は、中和エピトープを遮蔽する



分担研究報告書

HIV 多型的変異の薬剤耐性出現に対する影響

分担研究者 瀧永博之 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 専門外来医長

研究要旨 逆転写酵素の179番目のアミノ酸がValからAsp(V179D)に置換した多型的変異を持つ組換えHIV-1から、徐々に培養液中のefavirenz(EFV)濃度を上げることにより、EFV高度耐性のHIV-1を誘導する実験を3回行ったところ、2回の実験でV179Dに加えてV106Iが生じていた(V106I/V179D)。逆に、V106I変異を持つ組換えHIV-1から3回EFV耐性誘導実験を行ったところ、1回の実験でV179Dが生じた。V106I/V179Dの組み合わせは、EFV耐性を賦与する組み合わせであると思われる。

A. 研究目的

HIV-1の遺伝子を調べる薬剤耐性検査(genotypic assay)は、既知の薬剤耐性変異の有無で判定されるが、未知の耐性変異に対しては無力である。genotypic assayの臨床応用性を高めるためには、未知の耐性変異の同定が必要である。一方、患者体内のHIV-1は、たとえ未治療であっても、それぞれ固有の変異(多型的変異)を持ち、通常、それ自身は直接薬剤耐性を齎すことはない。しかし、そこから生じ得る耐性変異の発現パターンには、多型的変異が関与し、未知の耐性変異が生じる可能性が考えられる。

本研究では、未治療患者にも比較的良好に認められる逆転写酵素の多型的変異、179番目のアミノ酸をValからAspに置換する変異(V179D)の薬剤耐性発現に対する影響を解析する。

B. 研究方法

多型的変異を持つ組換えHIV-1を作成し、MT-2細胞に感染させて培養する。培養液中に低濃度の非核酸系逆転写酵素阻害薬であるefavirenz(EFV)を溶解し、HIV-1の増殖が十分に観察されたら、新たなMT-2細胞に感染させ、徐々に培養液中のEFV濃度を上げ、EFV高度耐性HIV-1を誘導する。得られた高度耐性株の逆転写酵素遺伝子領域を解析し、新たに継代培養中に生じた変異について解析する。

C. 研究結果

EFVに対する耐性誘導実験は、培養液中の濃度を3nMから徐々に1,000nMまで上げて、それぞれ3回行った。多型的変異を持たないwild-type HIV-1(NL4-3)からは、L100I、K103N/M230L、K103N/V108Iの変異の組み合わせが生じた。やはり、K103Nは生じやすい変異だと言える。多型的変異であるV179Dを持つ組換えHIV-1からは、L100I/V179D、L100I/V106I/V179D、V106I/V179D/M230Lの変異の組み合わせが生じた。3回中2回の誘導実験でV106Iが生じている。V106Iも未治療感染者に比較的良好に見られる多型的変異であるが、V106I/V179Dの組み合わせは、EFV耐性を賦与する可能性が考えられる。そこで、V106Iを持つ組換えHIV-1を作成し、同様にEFVによる耐性誘導実験を3回行ったところ、V106I/V179D、V106M/Y188C、L100I/V106I/Y181Cの変異の組み合わせが得られた。3回中1回の実験でV179Dが生じており、やはり、V106I/V179Dの組み合わせがEFV耐性を賦与する可能性が示唆された。

D. 考察

V179Dを持つHIV-1からのEFVによる耐性誘導実験で、3回中2回、V106Iが生じたが、wild-type HIV-1からの耐性誘導では生じていない。V106IがV179Dを持つHIV-1に特異的に生じたことになり、このことは、

V106I/V179D の組み合わせが EFV 存在下での HIV-1 の増殖に有利であることを示唆している。更に、逆に、V106I を持つ HIV-1 からの耐性誘導実験 3 回のうち 1 回で V179D が生じていることも、V106I/V179D の重要性を裏付けている。

これらのことを明らかにするため、来年度は、V106I/V179D の組み合わせを持つ HIV-1 を作成し、その薬剤感受性、増殖能などを解析することが必要である。また、もう一つの非核酸系逆転写酵素阻害薬である nevirapine による V179D を持つ HIV-1 からの耐性誘導も興味もたれるところである。

E. 結論

逆転写酵素の 2 つの多型的変異である V106I と V179D の組み合わせは、EFV 耐性を賦与する可能性がある。このことを明らかにするために、この 2 つの変異を持つ組換え HIV-1 を作成し、その薬剤感受性・増殖能を解析する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda M, Yogi A, Ishizuka N, Genka I, Gatanaga H, Teruya K, Tachikawa N, Kikuchi Y, Oka S. Effectiveness of subcutaneous growth hormone in HIV-1 patients with moderate to severe facial lipoatrophy. *Intern. Med.* 46: 359-362, 2007.
- 2) Yamanaka H, Gatanaga H, Kosalaraksa P, Matsuoka-Aizawa S, Takahashi T, Kimura S, Oka S. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. *J. Infect. Dis.* 195: 1419-1425, 2007.
- 3) Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, Asagi T, Itoh T, Yoshida S, Koike T, Oie M, Konda M, Sadamasu K, Nagashima M, Gatanaga H, Matsuda M, Ueda M, Masakane A, Hata M, Mizogami Y, Mori H, Minami R, Okada K, Watanabe K, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W, Kaneda T. Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human

immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 113-117, 2007.

- 4) Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. *Clin. Infect. Dis.* 45: 1230-1237, 2007.

2. 学会発表

- 1) 湯永博之、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、源河いくみ、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一、木村哲. 過去 5 年間に新規に診断された未治療 HIV-1 感染者の HIV-1 サブタイプと薬剤耐性変異 日本内科学会総会 2007 年 4 月
- 2) 渡辺珠代、安岡彰、阿部泰尚、神村麻穂子、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、源河いくみ、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一. HIV 合併ニューモシスチス肺炎における β -D-glucan 値の臨床的意義に関する検討 日本感染症学会総会 2007 年 4 月
- 3) 阿部泰尚、本田元人、渡辺珠代、神村麻穂子、渡辺恒二、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、源河いくみ、湯永博之、立川夏夫、照屋勝治、菊池嘉、片野晴隆、岡慎一. HIV に合併した Multicentric Castleman Disease (MCD) 3 例 日本感染症学会総会 2007 年 4 月
- 4) 湯永博之、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、源河いくみ、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、白阪琢磨、木村哲、岡慎一. 日本人とザンビア人における cytochrome P450 2B6 の遺伝子型と抗 HIV-1 薬 efavirenz の血中濃度の比較、およびその減量投与 日本感染症学会総会 2007 年 4 月
- 5) 立川夏夫、柳沢邦雄、後藤耕司、神村麻穂子、渡辺珠代、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永

- 博之、照屋勝治、菊池嘉、仲村秀太、塚田訓久、岡慎一。 AIDS リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma) 18 例の臨床的特徴の検討 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 6) 渡辺珠代、安岡彰、後藤耕司、柳沢邦雄、仲村秀太、神村麻穂子、渡辺恒二、本田元人、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 当院における HAART 時代の HIV 日和見合併症の動向 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 7) 神村麻穂子、後藤耕司、柳沢邦雄、仲村秀太、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 抗 HIV 療法 naïve 患者 124 例における Atazanavir の治療成績 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 8) 矢崎博久、後藤耕司、仲村秀太、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 当院での初回療法で使用された抗 HIV 薬の変遷と FPV 投与者の経過について 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 9) 林田庸総、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。 Efavirenz の血中濃度に関わる cytochrome P450 2B6 の遺伝子多型についての解析 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 10) 仲村秀太、後藤耕司、柳沢邦雄、渡辺珠代、神村麻穂子、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 当センターにおける急性 HIV 感染症 96 例の臨床検討 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 11) 本田美和子、仲村秀太、後藤耕司、柳沢邦雄、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、田沼順子、矢崎博久、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 高齢 HIV 感染者に高率に起こった lopinavir/ritonavir との関連を疑う不整脈の検討 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 12) 本田元人、後藤耕司、仲村秀太、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 日本人 HIV 患者における abacavir 関連 Hypersensitivity Reactions の発現頻度 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 13) 蜂谷敦子、児玉栄一、瀧永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一。 核酸系 (NRTI) および非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) に対する多剤耐性変異 N348I について ~その 1/基礎的検討 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 14) 蜂谷敦子、児玉栄一、瀧永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一。 核酸系 (NRTI) および非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) に対する多剤耐性変異 N348I について ~その 2/臨床解析 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 15) 田沼順子、斉藤可奈、後藤耕司、柳沢邦雄、仲村秀太、渡辺恒二、神村麻穂子、渡辺珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 初回治療として TDF/3TC を含む抗レトロウイルス療法を実施した HBe 抗原陽性 HIV 患者の臨床経過 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 16) 塚田訓久、立川夏夫、渡辺珠代、神村麻穂子、渡辺恒二、後藤耕司、斉藤可奈、仲村秀太、柳沢邦雄、本田元人、田沼順子、矢崎博久、本田美和子、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。 新規抗 HIV 薬の使用経験 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月
- 17) 杉浦亙、瀧永博之、吉田繁、千葉仁志、小池隆夫、伊藤俊広、原孝、佐藤武幸、石ヶ坪良明、上田敦久、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、福武勝幸、山元泰之、田中理恵、加藤信吾、宮崎菜穂子、岩本愛吉、藤野真之、仲宗根正、巽正志、椎野禎一郎、岡慎一、林田庸総、服部純子、浅黄司、伊部史朗、藤崎誠一

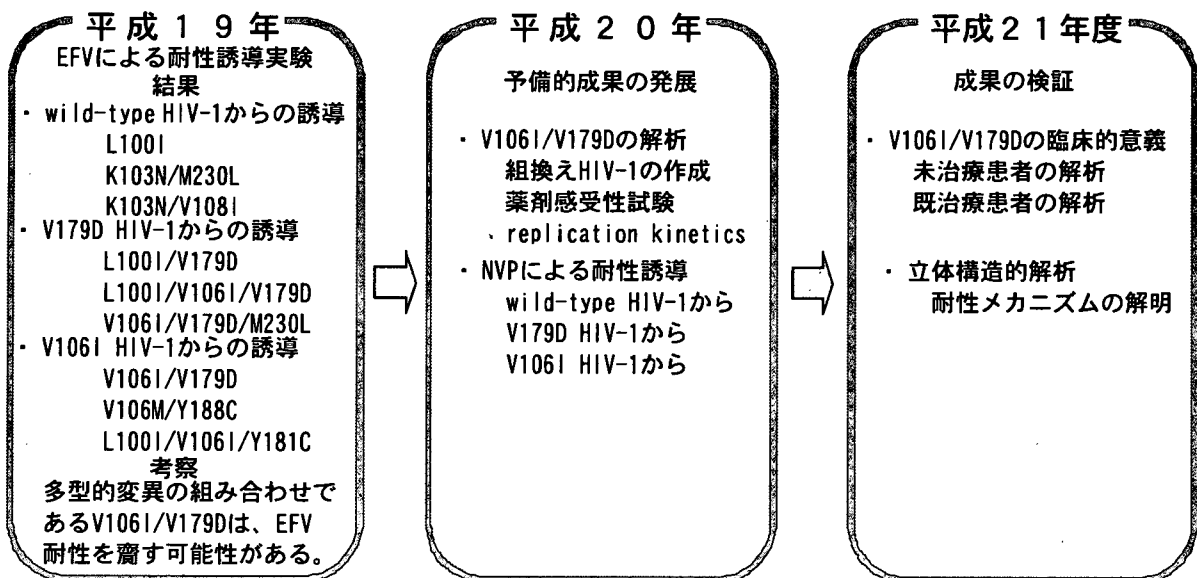
郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、下条文武、田邊嘉也、渡邊香奈子、白阪琢磨、桑原健、森治代、小島洋子、中桐逸博、高田昇、木村昭郎、南留美、山本政弘、松下修三、健山正男、藤田次郎。 2003-2006 年の新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性頻度の動向
日本エイズ学会総会 2007 年 12 月

1 8) 照屋勝治、田沼順子、仲村秀太、後藤耕司、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、塚田訓久、矢崎博

久、本田美和子、瀧永博之、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。 HAART 時代の日和見感染症－残された課題－非定型抗酸菌症 日本エイズ学会総会 2007 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。



治療薬変更を考慮したプロテアーゼ耐性変異パターン予測

分担研究者 遊佐敬介 熊本大学大学院 医学薬学研究部 講師

研究要旨 患者体内のウイルスは多様性に富んだウイルス集団からなる。その多様性は抗ウイルス薬などの淘汰圧に柔軟に適応し、薬剤耐性ウイルスという臨床治療上大きな問題を引き起こす。治療途上で、耐性ウイルス出現のために治療薬変更の際、事前に次に出現する耐性ウイルスの情報を得ることが可能になれば、変更後の治療に有用な評価系となろうと考えられる。本研究では、そのために患者体内のウイルスライブラリーを作製し、試験管内で短期間に変更後の出現耐性ウイルスの予測が可能かどうかを調べる。

A. 研究目的

1990年代に端を発したHIV感染者に対する抗ウイルス薬による治療の成績は、強い効果を持つ新規の薬剤開発とその複数の薬剤を組み合わせた強力な抗レトロウイルス療法によってめざましい進歩を遂げた。その一方、明らかになったことは、その効果が感染増殖を繰り返すウイルスには有効ではあっても感染細胞のゲノム中で不活性化している latent なウイルスに対しては必ずしも効果的でないことである。つまり、現時点の化学療法では、体内からウイルスを一掃し、治癒するということはできない。この事実は必然的に長期投与による副作用という問題と、治療薬剤に対する感受性低下、いわゆる耐性ウイルスの出現という 2 つの問題を提起することになった。

抗ウイルス薬による治療を行い、その途上に耐性ウイルスが出現し、その治療効果が低下した場合、新しい薬剤に変更する必要がある。治療薬の変更にあたり、考慮されるのは、感染者体内のウイルスの薬剤のターゲットとなる逆

転写酵素、プロテアーゼがもつ耐性変異パターンと、時にそのウイルスの in vitro における抗ウイルス薬の感受性(感受性試験)である。しかしここで問題になるのは、そのデータは患者体内の major なウイルスポピュレーションの性質を反映したものに過ぎないという点である。感染者体内の HIV-1 は均一ではない。感染後、体内では多様な変異をもつヘテロなウイルスが絶えず生み出され、異なる変異をもつ minor なウイルスポピュレーションが存在している。耐性変異パターンや感受性試験は、含まれる minor ウイルス、特に治療薬の変更後に耐性ウイルスとして、major なウイルスに置き変わる minor なウイルスについての情報を与えてくれない。得られるのは、あくまでも治療薬変更時の major ポピュレーションに関する情報に限られる。われわれの研究目的は治療薬変更時に、minor な耐性ウイルスの情報を前もって提供するための新しい評価系をつくることにある。

このため感染者の体内のウイルスポピュレーションのプロテアーゼ領域を PCR で増幅し、ウイ

ルスプロテアーゼライブラリーという形で分子クローン HIV-1_{NL4.3}にそのまま写し取り、試験管内で短時間にライブラリーウイルスに含まれている耐性ウイルスに関する変異および感受性を調べる評価系を確立する。

B. 研究方法

(1) 患者データベースの解析分析

患者データベース(Stanford 大学)を解析し、プロテアーゼ阻害剤を含む複数の抗ウイルス薬によって治療歴があり、プロテアーゼ阻害剤に対する感受性が低下した患者を選ぶ。

(2) 患者の血しょうから、ウイルスプロテアーゼをコードしている領域をふくむ領域をPCR で増幅する。血しょう中のウイルスを遠心で沈降させた後、ウイルスRNAを調製し、RT-PCRとPCRによってウイルスプロテアーゼ領域を含む 590 bp DNA 断片を得た。そして、このウイルスプロテアーゼを最終的にHVI-1 分子クローン NL4-3 に挿入した。ここで、得られたウイルスライブラリーは、そのサイズが >100,000であった。ウイルスライブラリーDNAを調製し、293T細胞にトランスフェクションし、24 h後その上清に含まれるウイルスを回収し、-80℃に保存した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の臨床材料をもちいるのでその扱いには細心の注意を払った。必要に応じて関連機関の倫理審査をうけ、提供者の承諾とプライバシーの保護に努めた。

C. 結果

平成 19 年度は、耐性ウイルスが出現するのを

予測できるかどうかを調べるために、モデルとなる患者治療プロフィールを検索し、HIV-1 感染者で数年にわたって逆転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤による多剤併用治療を行っていた患者データから、本研究に適した治療歴と、ウイルスの変異データを比較検討した。その結果から 5 名の患者を選んだ。そして、うち2名の患者の治療薬の変更前の患者血清を用いて、RT-PCR により protease 領域を増幅し、HIV-1_{NL4.3} に組み込み、その治療時点での患者ウイルスプロテアーゼライブラリーを作製した。得られたウイルスライブラリーはそのサイズが >10⁵ であり、体内のウイルスの多様性を十分反映しているものと考えられた。しかしプロテアーゼ阻害剤の耐性は、かならずしもプロテアーゼをコードしている領域のアミノ酸置換によって獲得されるわけではなく、その上流における変異も関係している場合がある。本実験で作製したウイルスライブラリーは、プロテアーゼの上流 300 ベースも含む。これによって、プロテアーゼの切断部位を含む Gag 領域の一部も含むウイルスライブラリーを作製することが出来た。

D. 考察

今後は、作製した患者由来のウイルスプロテアーゼライブラリーが臨床での患者体内のウイルス組成を反映しているかどうかについて、解析する。この点を解析し、実験に供するに十分な品質が確認できた後、治療薬変更後に出現した耐性ウイルスが、in vitro で予測できるかどうかを調べる予定である。現在使われるのは、治療前のウイルスプロテアーゼの変異のデータと感受性だが、それはあくまでも患者のその時点

での major population の情報にすぎない。治療薬の変更による新たな耐性ウイルスの予測は治療薬の選定に新たな情報となる。もし治療薬変更前にすでに変更後に出現する耐性ウイルスが、in vitro で事前に確認できるなら、こうした手法は、治療薬を変更する際の有用な情報となることが期待される。

E. 結論

患者データベースを解析し、プロテアーゼ阻害剤を含む複数の抗ウイルス薬によって治療歴があり、プロテアーゼ阻害剤に対する感受性が低下した患者を選び、うち2名の患者の治療薬の変更前の患者血清を用いて患者ウイルスプロテアーゼライブラリーを作製することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada S, Monde K, Tanaka Y, Kimura T, Maeda Y, Yusa K. Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology*, 370: 142-150, 2008.
- 2) Maeda Y, Yusa K., Harada S. Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid

substitution in the V3 region of gp120.

Antiviral Res., 77: 128–135, 2008.

- 3) Monde K, Maeda Y, Tanaka Y, Harada S, Yusa K. Gp120 V3-dependent impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J. Biol. Chem.* 282: 36923-36932, 2007.

- 4) Harada S, Yokomizo K, Monde K, Maeda Y, Yusa K. A broad antiviral neutral glycolipid, fattiviracin FV-8, is a membrane fluidity modulator. *Cell. Microbiol.* 9: 196-203, 2007.

2. 学会発表

Yusa, K., Maeda, Y., Monde, K., Harada, S. Prediction of protease genotype prior to protease inhibitor treatment switching by patient HIV-1 library. *Keystone Symposia HIV Vaccine and HIV Pathogenesis*, March 25-30, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし。