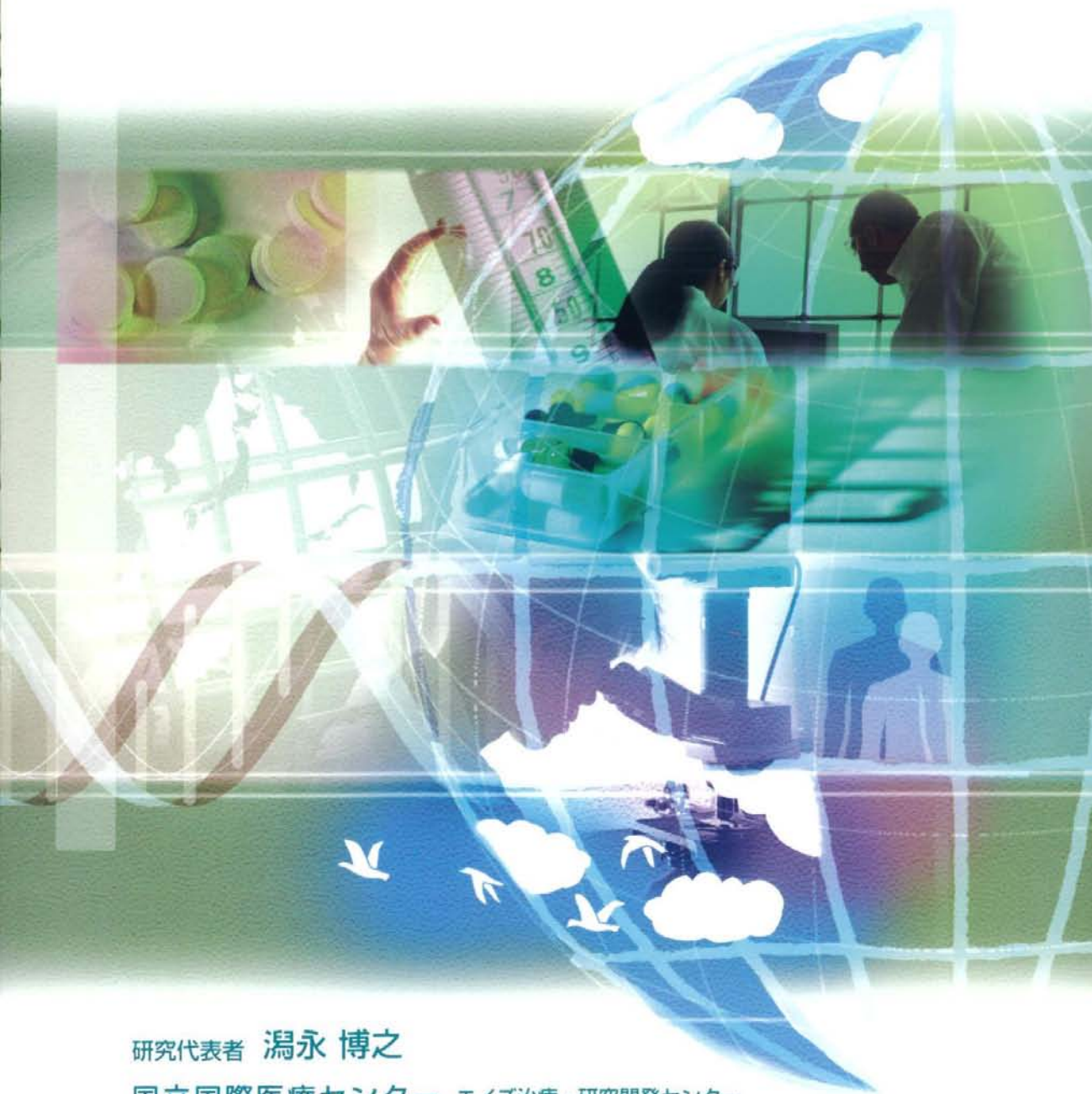


200830036A

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業 平成20年度総括・分担研究報告書

# 抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究



研究代表者 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

平成21(2009)年3月

平成20年度  
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

—平成20年度 総括・分担研究報告書—

## 抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者	湯永 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
研究分担者	杉浦 互	国立感染症研究所 エイズ研究センター 第2グループ
研究分担者	太田 康男	帝京大学医学部 内科学講座
研究分担者	児玉 栄一	京都大学ウイルス研究所 感染免疫研究領域
研究分担者	吉村 和久	熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野
研究分担者	鈴木 康弘	東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座 感染病態学分野
研究分担者	横幕 能行	(独)国立病院機構 名古屋医療センター 感染症科・臨床研究センター
研究分担者	関 康博	熊本大学大学院医学薬学研究部 血液内科学・感染免疫診療部
研究分担者	蜂谷 敦子	国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター
研究分担者	塚田 訓久	国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター
研究分担者	本田 元人	国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

# 目次

## ◆総括研究報告書

抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究 .....	2
湯永 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	

## ◆分担研究報告書

抗HIV薬の効果と毒性の解析 .....	6
湯永 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	

抗HIV薬の効果に関わる因子の研究 .....	12
杉浦 互 国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ	

免疫再構築の分子機序の解析 .....	18
太田 康男 帝京大学医学部内科学講座	

融合阻害薬・インテグラーゼ阻害薬の <i>in vitro</i> 研究 .....	22
児玉 栄一 京都大学ウイルス研究所感染免疫研究領域	

中和抗体の臨床応用に関する研究 .....	28
吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野	

侵入阻害薬の及ぼす分子的な影響の解析 .....	32
鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座感染病態学分野	

新規薬剤の臨床効果の解析 .....	36
横幕 能行 (独)国立病院機構名古屋医療センター感染症・臨床研究センター	

新規プロテアーゼ阻害薬の <i>in vitro</i> 研究 .....	42
関 康博 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部	

薬剤耐性メカニズムに関する研究 .....	46
蜂谷 敦子 国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター	

抗HIV療法の臨床効果に関する研究 .....	50
塚田 訓久 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター	

抗HIV薬の副作用・相互作用に関する研究 .....	54
本田 元人 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター	

研究成果の刊行物に関する一覧 .....	57
----------------------	----

# 1. 総括研究報告書



## 抗HIV薬の適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究

研究代表者

湯永 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 治療開発室長

研究分担者

杉浦 亙 国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ 研究員

太田 康男 帝京大学医学部内科学講座 教授

見玉 栄一 京都大学ウイルス研究所感染免疫研究領域 助教

吉村 和久 熊本大学エイズ学研究中心病態制御分野 講師

鈴木 康弘 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座 講師

横幕 能行 (独)国立病院機構名古屋医療センター感染症科・臨床研究センター 医師

関 康博 熊本大学大学院医学薬学研究部血液内科学・感染免疫診療部 特定事業研究員

蜂谷 敦子 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 臨床検査技師

塚田 調久 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 医師

本田 元人 国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 医師

### 研究要旨

抗HIV薬の適正使用をガイドするため、多剤耐性となったHIV-1感染患者よりHIV-1を分離・培養し、新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬efavirenz、新規のプロテアーゼ阻害薬darunavir、融合阻害薬enfuvirtide、インテグラーゼ阻害薬raltegravirの有効性を確認した。また、この臨床分離株の解析過程で、新規の核酸系逆転写酵素阻害薬耐性変異を同定した。CCR5を発現させたCD4陽性T細胞株を用いることにより、侵入阻害薬maraviroc耐性HIV-1の誘導に成功した。既存の融合阻害薬のアミノ酸を置換することにより、耐性HIV-1が出現しにくい新たな融合阻害薬をデザインし、その効果を確認した。抗HIV療法導入後の免疫再構築症候群の病態を解明するために、T細胞サブセットの解析を行ったところ、CD4数が低いHIV感染者ではregulatory T細胞の割合が高く、抗HIV療法導入後、その割合が減少することを見いだした。臨床的には、進行性多巣性白質脳症合併症例の抗HIV療法導入時にステロイドを併用することにより免疫再構築症候群を予防できる可能性を示した。抗HIV療法とワーファリンとの併用例が増えているが、相互作用の問題がある。Ritonavirでboostしないfosamprenavirを使うことでワーファリン併用も可能になることを示した。プロテアーゼ阻害薬投与後の徐脈性不整脈はlopinavirによるものが多かったが、3例でdarunavirに変更したところ、2例で投与可能であった。次々と新薬が導入される現状で抗HIV薬の適正使用・副作用や他剤との併用の問題を解決するために3年計画で立ち上げた研究班であるが、初年度の成果として、ほぼ順当なものが得られている。

### A. 研究目的

新規抗HIV薬の適正な使用をガイドするために、HIV専門の臨床医と、新薬・薬剤耐性の研究者からなる特色ある研究班を組織し、臨床と基礎の両面から新薬による治療指針のもとになるデータを提供することを目指す(柱1:新規薬剤の適正使用に関する

基礎的研究)。また、治療に伴う毒性や他剤との相互作用、治療導入後の免疫再構築症候群(IRIS)のメカニズムを解析し、これらの有害事象を回避するための治療法を探索する(柱2:抗HIV薬の効果と毒性に関する研究)。

## B. 研究方法

柱1では、多剤耐性症例より、MAGIC-5細胞を用いてHIVを分離培養し、薬剤感受性を測定する。症例によっては、経時的なウイルス分離も行い、新たに出現した変異の薬剤感受性に対する影響などを組み替えHIVなどにより解析する。また、日本人の未治療患者に比較的好く認められる多型的変異を持つ組み替えHIVから薬剤存在下での培養により、薬剤耐性変異を選択し、その効果を更に組み替えHIVを作成して解析する。CCR5阻害薬であるmaraviroc (MVC)耐性HIVの選択については、PM1/CCR5細胞を用いて継代培養を行う。新規薬剤の開発として、融合阻害薬であるC34のアミノ酸を置換し、水溶性を増加し、gp41に結合する際の $\alpha$ -helixを安定化させ、更に強力な融合阻害薬の作成を試みる。また、プロテアーゼ阻害薬(PI)のP2部位にcyclopentanyltetrahydrofuranylurethaneを持つ化合物のスクリーニング・解析を行う。

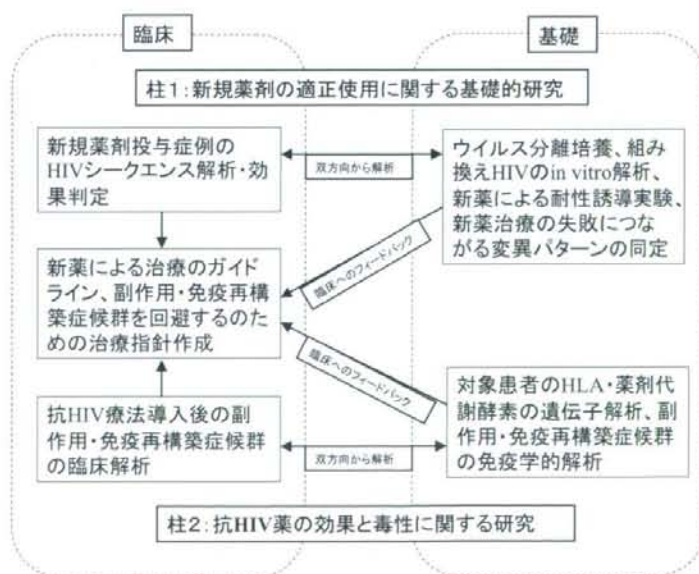
柱2では、FACS解析により、抗HIV療法導入前後の免疫担当細胞のポピュレーションの変化を調べ、IRISの発症メカニズムを探索する。また、抗HIV療法とステロイドを併用することなどにより、IRISの臨床的な回避を試みる。患者の高齢化に伴い、efavirenz (EFV)やPIとの併用が難しいワーファリンの使用頻度が増しているが、ワーファリン併用時の適切な抗HIV療法を検討する。PI投与後に、徐脈性不整脈が日本人に比較的特異的に認められているが、臨床的な回避法を模索する。

## (倫理面への配慮)

国立国際医療センター・(独)国立病院機構名古屋医療センターの患者のHIV・HLA・遺伝子を解析することとなる。患者血液サンプルからHIVを分子生物学的およびウイルス学的に解析すること、患者末梢血液細胞を免疫学的に解析すること、患者本人のHLAを解析すること、患者本人の薬物代謝酵素の遺伝子を解析することについては、国立国際医療センター・(独)国立病院機構名古屋医療センターのそれぞれの倫理委員会で承認済みである。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを記入していただく。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存することを義務付ける。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととする。

## C. 研究結果

柱1においては、5例の多剤耐性患者よりHIVを分離培養し、薬剤感受性を測定し、臨床効果との相関を解析した。3例はdarunavir (DRV)に耐性であったが、うち2例ではHIVをコントロールできており、併用した融合阻害薬enfuvirtide (ENF)とインテグラーゼ阻害薬raltegravir (RAL)が有効であったと考えられる。治療失敗の1例は、ENFのみが有効であったが、投与中にENFに対する耐性変異が生じていた。新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬(NNRTI)であるetravirine (ETR)の効果は有望で、既存のNNRTIであるEFVやnevirapineに100倍以上の高度耐性となった。



株に対しても効果を有していた。これらの臨床分離株の解析過程で、多くの核酸系逆転写酵素阻害薬(NRTI)に対し耐性となるQ151M-complexにK70Q変異が加わるとtenofovir (TDF)に対し高度耐性となることを見いだした。また、実験株の*in vitro*の培養によって、EFVとMVCに対する新たな薬剤耐性変異パターンを同定した。更に、gp41とより強力に結合する新規の有望な融合阻害薬・2つの結合様式でプロテアーゼに結合する強力な新規PIを同定し、ウイルス学的解析を行っている。

柱2においては、CD4数が低いHIV感染者ではregulatory T細胞の割合が高く、また、抗HIV療法導入前後の免疫担当細胞のポピュレーションの変化を解析したところ、regulatory T細胞の割合が減少することを見いだした。臨床的には、進行性多巣性白質脳症(PML)合併症例の抗HIV療法導入時にステロイドを併用することによりIRISを予防できる可能性を示した。Ritonavir (RTV)でboostしないfosamprenavir (FPV)を使うことでワーファリン併用も可能になることを示した。PI投与後の徐脈性不整脈はlopinavirによるものが多かったが、3例でDRVに変更したところ、2例でDRV投与可能であった。

#### D. 考察

多剤耐性症例に対しては、強力なPIに積極的にETRやRALを併用すべきと考えられる。DRV耐性症例であっても、これらの併用により臨床的なコントロールを得ることが可能と思われる。多くのNRTIに対し耐性となるQ151M-complexには、TDFのみが唯一有効なNRTIであるが、K70Q変異が加わるとTDFも無効となるため、臨床的に驚異である。MVCを初めとするケモカインレセプターの阻害薬に対する耐性HIVの選択は極めて困難と言われており、論文上の報告も数本しかない。PM1/CCR5細胞を使った新たな系を確立することにより、耐性HIVを選択することが可能となった。HIVのtropism自身は変わっていないと思われ、今後臨床においても、CCR5-tropicなHIVのみの患者から耐性HIVが発現してくる可能性を示唆している。融合阻害薬の水溶性を増し $\alpha$ -helixを安定化させる手法は、より強力な融合阻害薬の作成に成功したといえ、また、2つの結合様式でプロテアーゼに結合する新規PIは耐性発現が困難と考えられ有望である。

CD4が低い患者はregulatory T細胞の割合が高く、抗HIV療法導入後regulatory T細胞の割合が減少することは、IRIS発症の原因の一つと考えられる。また、臨床的には、一例であるが、ステロイド併用により、PML症例にIRISを起こすことなく抗HIV療法を導入できており、今後も症例を増やして解析すべきであ

る。ワーファリン併用時の抗HIV療法については、EFVとRTV-boostが難しいことが判明しnon-boost FPVを用いたが、今後はRALも有望と思われる。PI投与後の徐脈性不整脈については、PIの種類を変更することで回避できる可能性を示すことができた。

#### E. 結論

新規薬剤の適正な使用をガイドするため、薬剤耐性変異の解釈、新規薬剤の適切な使用法、既存薬剤のより強力な薬剤への改良、IRISの発症メカニズム解明と回避法の探索、併用薬との相互作用の解明、など多岐に渡る課題について研究に取り組んでおり、初年度の計画は概ね達成している。多剤耐性の臨床分離株については、組み替えHIVを作成するなどして、薬剤感受性を大きく変えうる重要な変異の同定ができれば、耐性変異パターンから最適な治療薬の選択が容易になると考えられる。MVCに対する耐性変異の報告は少なく、今後組み替えgp120を用いて解析を進めていくことなどにより、耐性メカニズムの解明に大きく貢献できると期待される。今後使用頻度が増えると思われるRALについては、ターゲットとなるインテグラーゼが多型的変異に富むため、これらの感受性への影響を解析し、臨床にフィードバックすることが必要と思われる。IRISの発症メカニズム解析・回避法探索は臨床的に強く望まれることであり、更なるデータ・症例の蓄積が求められる。PI投与時の徐脈性不整脈については、日本人に比較的多いと考えられ、本邦において解決すべき問題であるが、投与するPIの種類を変更することで回避できる可能性が示された意義は大きい。ワーファリン併用時の抗HIV療法は臨床に直結した問題で、本研究による結果を次の症例に応用しつつデータを積み重ねていくことが重要と考えられる。いずれも臨床のニーズに即した問題を扱っており、今後の研究の継続・進展は、社会的意義が大きい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

各研究分担者の頁参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. バキュロウイルスによる迅速ビオチン化・分泌gp120作成法 (予定)
2. インテグラーゼ阻害薬に対するHIV薬剤感受性検査法 (予定)



---

## II. 分担研究報告書



## 抗HIV薬の効果と毒性の解析

研究分担者

潟永 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 治療開発室長

### 研究要旨

TaqMan assayによるHIV-1量の測定は、従来用いられていたAmplicor Monitorによる値と解離することがあり、Amplicor Monitorで検出限界以下になっても、約3割の患者にてTaqMan assayで50 copies/ml以上になる。しかし、TaqMan assayで400 copies/mlくらいまでであれば、治療失敗ではなく、同じ治療を継続してよいと考えられる。TaqMan assayでウイルスが検出される患者の割合は、Amplicor Monitorで最近検出限界以下になった患者ほど多く、有効な治療を継続すると、HIV-1量は検出限界以下になった後も、減少していくと考えられる。また、抗HIV-1療法導入後の免疫再構築症候群が臨床上大きな問題となっているが、その発症メカニズムを探るためregulatory T細胞の数と割合の推移を解析したところ、CD4陽性細胞の中のregulatory T細胞の割合がCD4数200以下の患者で有意に低下していることを見いだした。更に、抗HIV-1療法導入後、この割合が速やかに低下することが明らかになった。このことから、特にCD4が低い患者では、抗HIV-1療法導入前はregulatory T細胞の割合が高いが、治療導入後に急激に低下し、過剰な免疫状態が起こり免疫再構築症候群を引き起こす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

抗HIV薬の臨床効果として、血中HIV-1量の定量は最も重要な指標である。2008年3月にHIV-1の定量法として、それまで使用されていたRoche Cobas Amplicor MonitorがRoche Cobas TaqMan assayに切り替えられた。結果として、それまでAmplicor Monitorで数年間検出限界以下のウイルス量が続いていた多くの症例でウイルスが検出されるようになり、医療現場に混乱を与えている。TaqMan assayで検出されるウイルス量を臨床的に解釈することを目標とする。また、抗HIV-1療法(HAART)導入後の免疫再構築症候群(IRIS)の発症メカニズムを解明することを目標とする。

### B. 研究方法

2008年3月から6月までに、1,387人のHIV-1患者がACCを外来受診し、その血中ウイルス量が

TaqMan assayにより測定されている。TaqMan assayにより得られたデータを、従来のAmplicor Monitorの値と比較してみる。また、健常人およびHIV-1患者の末梢血から単核球を分離し、CD4陽性細胞を分離し、その中のFOXP3陽性細胞の割合を調べることにより、regulatory T細胞の数を解析する。

### (倫理面への配慮)

患者血液サンプルからHIVを分子生物学的およびウイルス学的に解析すること、患者末梢血液細胞を免疫学的に解析することについては、国立国際医療センターの倫理委員会で承認済みである。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、倫理規定に従い同意書に自筆のサインを記入していただく。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存することを義務付ける。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととする。

### C. 研究結果

TaqMan assayでHIV-1量を測定した1,387人の患者のうち、876人が定期受診している患者で、かつ、前回の受診時Amplicor Monitorで検出限界以下(<50 copies/ml)であった。そのうち、253人(28.9%)の患者で治療法を変更していないにもかかわらず、TaqMan assayで50 copies/ml以上となった。更に、22人(2.5%)の患者で40 copies/ml以上のウイルス量が検出され、128人(14.6%)の患者で40 copies/ml以下ではあるがウイルスが検出された(図1)。次に、TaqMan assayによる検出率とAmplicor Monitorによる検出限界以下が継続した期間の関係を解析した。Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間が1年未満の患者のうち、43.7%の患者がTaqMan assayで50

copies/ml以上となったが、Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間が4年以上の患者では、TaqMan assayで50 copies/mlとなったのは18.5%の患者のみであった。逆に、Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間が1年未満の患者のうち、TaqMan assayでもHIV-1が検出されなかったのは37.3%のみであるが、Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間が4年以上の患者では、70.2%もの患者のHIV-1がTaqMan assayでも検出されなかった(図2)。従って、TaqMan assayでHIV-1量が50 copies/ml以上となる患者の割合は、Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間と負に相関しており( $R^2 = 0.895$ )、TaqMan assayでもHIV-1が検出できない患者の割合は、Amplicor Monitorによる検出限界以下の期間と正に相関していた( $R^2 = 0.979$ )。

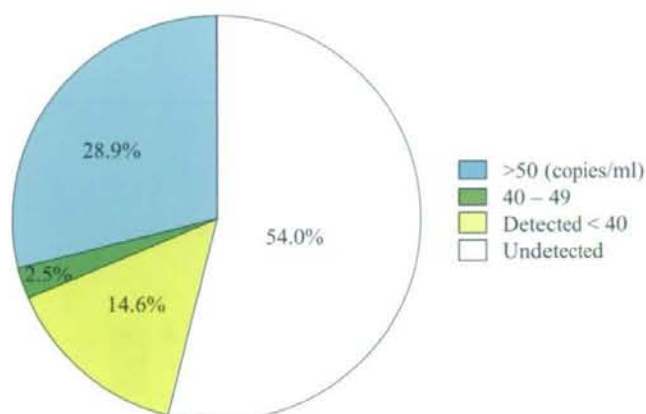


図1. Amplicor MonitorでHIV-1量が検出限界以下だった期間と、TaqMan assayによるHIV-1量定量結果

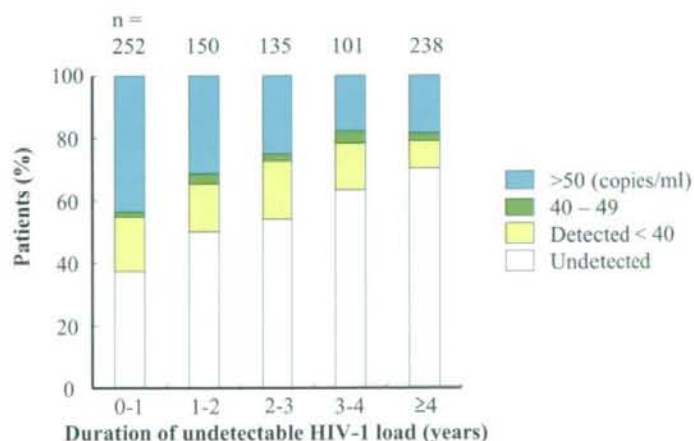


図2. Amplicor MonitorでHIV-1量が検出限界以下だった患者876人の、TaqMan assayによるHIV-1量定量結果

また、21人の健常人と95人の未治療HIV-1感染者でregulatory T細胞の数を解析したところ、CD4数200以下の患者（27人）では、regulatory T細胞の絶対数は、健常人やCD4数200以上の患者よりも少ないが、そのCD4陽性細胞数に占める割合は、健常人やCD4数200以上の患者よりも多いことが判明した（図3）。更に、抗HIV-1療法導入後のregulatory T細胞の数の推移を解析したところ、急激に低下することが明らかとなった（図4）。

#### D. 考察

Amplicor Monitorで検出限界以下であった患者にTaqMan assayで検出されたウイルス量の多くは、400 copies/ml以下であり、このレベルまでは、治療失敗ではなく、同じ治療を継続してよいと考えられた。有効な治療が長く継続するほど、多くの患者のHIV-1が検出できなくなる傾向にあり、Amplicor Monitorで検出限界以下になった後も、治療を継続することにより、HIV-1量が低下し続けることが示唆された。

特に、CD4数が低い患者では、CD4数が低いことのみならず、regulatory T細胞の割合が高いため、免疫反応がより強く抑制されている可能性があり、抗HIV-1療法導入後は急激にregulatory細胞の割合が減少するため、CD4数の回復以上に、免疫反応が強く現れる、というメカニズムにより、免疫再構築症候群を引き起こす可能性が示された。

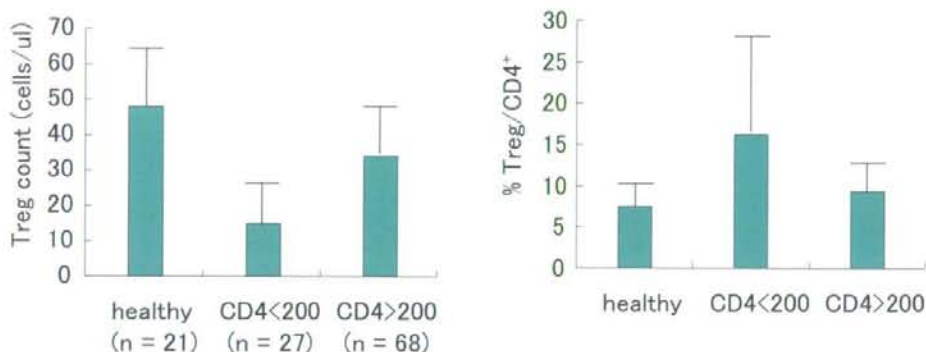


図3. 健常人、CD4数200以上と200未満のHIV-1感染者のregulatory T細胞の数と割合

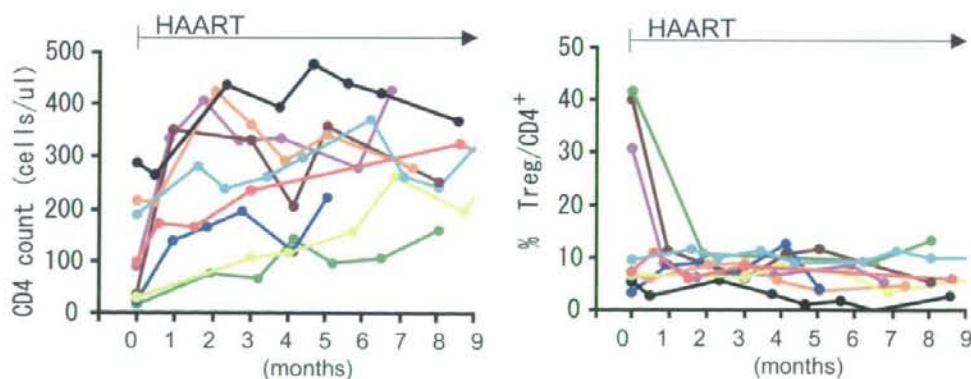


図4. HAART導入後のCD4陽性細胞数とregulatory T細胞の割合の推移

## E. 結論

TaqMan assayによるHIV-1量の測定は、従来用いられていたAmplicor Monitorによる値と解離することがあり、Amplicor Monitorで検出限界以下になっても、約3割の患者にてTaqMan assayで50 copies/ml以上になる。しかし、TaqMan assayで400 copies/mlくらいまでであれば、治療失敗ではなく、同じ治療を継続してよいと考えられる。

CD4数の低い患者では、regulatory T細胞の割合が高く、日和見感染症などに対する免疫が抑制されていると考えられるが、抗HIV-1療法導入後、この割合が急激に減少し、免疫反応が惹起されるため、免疫再構築症候群が起こるといふメカニズムが明らかになった。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matsuoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, Oka S. HLA-A\*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes. Infect.* 10: 689-698, 2008.
2. Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. *Pharmacogenetics* 9: 207-214, 2008.
3. Hayashida T, Gatanaga H, Tanuma J, Oka S. Effects of low HIV-1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24:495-498, 2008.
4. Hachiya A, Kodama E, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S. Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Virol.* 82:3261-3270, 2008.
5. Gatanaga H, Oka S. Successful genotype-tailored treatment with small-dose efavirenz. *AIDS* 23: 433-434, 2009.
6. Gatanaga H, Honda H, Tsukada K, Tanuma J, Yazaki H, Honda M, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. Detection of HIV-1 load by the Roche COBAS TaqMan assay in patients with previously undetectable load by the Roche COBAS Amplicor Monitor. *Clin. Infect. Dis.* 48: 260-262, 2009.

7. Bi X, Suzuki Y, Gatanaga H, Oka S. High frequency and proliferation of CD4+FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected patients with low CD4 count. *Eur. J. Immunol.* 39: 301-309, 2009.

### 2. 学会発表

1. Tanuma J, Ishigaki K, Hachiya A, Gatanaga H, Trung Nguyen T, Lien Trinh TM, Hien Nguyen D, Oka S. Drug resistance mutations in patients with CRF01\_AE HIV-1 failing antiretroviral therapy in Hanoi, Vietnam. The 17th International AIDS Conference, Mexico City, Mexico. August, 2008, Mexico City, Mexico.
2. 湯永博之. シンポジウム「HIV感染症治療の最前線」進化した抗HIV療法と残された問題 日本感染症学会総会. 2008年. 松江.
3. 林田庸総, 湯永博之, 田沼順子, 本田元人, 後藤耕司, 菊池嘉, 岡慎一. HIV-1感染者におけるBEDアッセイに対するウイルス量と抗HIV-1治療の影響 日本感染症学会総会. 2008年. 松江.
4. 田沼順子, 大金美和, 矢崎博久, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池嘉, 岡慎一, 瓜生英子, 山中純子, 国方徹也, 宮澤廣文, 松下竹次, 源河いくみ. 当院におけるHIV合併妊娠に対する抗レトロウイルス療法 日本感染症学会総会. 2008年. 松江.
5. 柳沢邦雄, 本田元人, 湯永博之, 仲村秀太, 後藤耕司, 渡辺恒二, 神村麻穂子, 渡辺珠代, 塚田訓久, 田沼順子, 矢崎博久, 本田美和子, 照屋勝治, 立川夏夫, 菊池嘉, 岡慎一. Fluconazole (FLCZ)とMiconazole (MCFG)の併用療法が有効と考えられたHIV感染者におけるCandida albicans脊髄炎の一例 日本感染症学会総会. 2008年. 松江.
6. 中村春香, 渡辺恒二, 塚田訓久, 矢崎博久, 田沼順子, 本田美和子, 湯永博之, 照屋勝治, 菊池嘉, 岡慎一. 糞線虫症をきたしイベルメクチン内服が奏功したHIV感染タイ人女性の1例 日本感染症学会東日本地方学術集会. 2008年. 10月.
7. 青木孝弘, 塚田訓久, 渡辺珠代, 本田美和子, 照屋勝治, 湯永博之, 菊池嘉, 岡慎一. HAART開始時よりステロイド併用しPMLの免疫再構築に備えた1例 日本感染症学会東日本地方学術集会. 2008年. 埼玉.
8. 湯永博之. 新規標的に対する抗ウイルス薬の臨床的意義? 日常臨床への新薬導入? 我が国における新薬導入の課題 日本エイズ学会総会. 2008年. 大阪.
9. 湯永博之. 抗HIV薬治療の変遷とPIの位置づけ 日本エイズ学会総会. 2008年. 大阪.
10. 今村顕史, 湯永博之, 花房秀次, 日笠聡. HIV感染症「治療の手引き 第12版」エキスパートに聞く~処方に対する考え方 日本エイズ学会総会. 2008年. 大阪.

11. 今村顕史、小田原隆、湯永博之、小島賢一、村松崇、榎谷法生、中田たか志。現在のHIV診療が抱える他科連携の問題点を総括する。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
12. 本田元人、湯永博之、西島健、青木孝弘、中村春香、田里大輔、柳沢邦雄、渡辺恒二、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、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。Warfarinと抗HIV薬併用症例の検討。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
13. 田里大輔、中村春香、西島健、青木孝弘、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、田沼順子、本田美和子、照屋勝治、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。当センターで経験したHAART時代のAIDS関連カポジ肉腫90例の検討。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
14. 渡辺珠代、安岡彰、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、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、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院におけるHAART時代の日和見感染症の動向。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
15. 蜂谷敦子、嶋根和毅、児玉栄一、小泉寛和、湯永博之、松岡雅雄、滝口雅文、岡慎一。逆転写酵素connectionとRNase H subdomainの多様性と薬剤感受性に及ぼす影響。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
16. 神村麻穂子、中村春香、西島健、青木孝弘、田里大輔、渡辺恒二、渡辺珠代、本田元人、矢崎博久、塚田訓久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。HBs抗原陽性HIV患者に導入したTDF/3TC(FTC)を含む抗HIV療法の効果。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
17. 高橋佳子、池田和子、島田恵、今井公文、湯永博之、岡慎一。HIV感染症患者における非就労の背景要因に関する研究。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
18. 八鍬類子、杉野祐子、島田恵、荒井理那、伊藤紅、石垣今日子、山田由紀、武田謙治、大金美和、池田和子、遠藤貴子、西垣昌和、数間恵子、湯永博之、岡慎一。HIV/AIDS患者の脂質代謝コントロールのための健康行動支援の検討。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
19. 塚田訓久、青木孝弘、田里大輔、中村春香、西島健、神村麻穂子、柳沢邦雄、渡辺恒二、渡辺珠代、田沼順子、本田元人、矢崎博久、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、立川夏夫、菊池嘉、岡慎一。新規抗HIV薬の使用経験と有害事象。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
20. 渡辺恒二、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、柳沢邦雄、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、本田美和子、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院におけるアタザナビル使用473症例の検討。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
21. 矢崎博久、中村春香、青木孝弘、西島健、田里大輔、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、湯永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院での新規抗HIV薬の変遷とFPV投与者の経過について(統報)。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
22. 照屋勝治、西島健、中村春香、田里大輔、青木孝弘、渡辺恒二、柳沢邦雄、神村麻穂子、渡辺珠代、塚田訓久、本田元人、矢崎博久、田沼順子、本田美和子、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。HIV合併結核における抗結核薬の有害事象についての検討。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
23. 林田庸総、湯永博之、菊池嘉、岡慎一。当センターにおけるBEDアッセイを用いた2003年と2007年以降の新規患者の解析。日本エイズ学会総会。2008年。大阪。
24. 杉浦互、湯永博之、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、藤井毅、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、伊部史朗、藤崎誠一郎、金田次弘、浜口元洋、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡邊香奈子、渡邊大、白阪琢磨、桑原健、森治代、小島洋子、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。2003-2007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。2008年。大阪。  
各研究分担者の頁参照

## II. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし





## 抗HIV薬の効果に関わる因子の研究

研究分担者

杉浦 亙 国立感染症研究所エイズ研究センター第2研究グループ 研究員

研究協力者

伊部 史朗 (独)国立病院機構名古屋医療センター

臨床研究センター感染免疫部 流動研究員

正岡 崇志 (財)エイズ予防財団 リサーチレジデント

### 研究要旨

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするためにインテグラーゼ遺伝子の多様性の解析、インテグラーゼの基質であるウイルスDNAの変異の可能性に着目して、HIVのラルテグラビル耐性獲得機構解明、さらに無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化に取り組んだ。その結果、インテグラーゼが多様性に富む遺伝子であり、また既存の薬剤投与により影響を受けている可能性が明らかになった。またコムギ無細胞系を用いて、安全、簡便かつハイスループットにプロテアーゼ活性を検出する事の出来る新規薬剤耐性検査法の基盤技術の構築に成功した。

### A. 研究目的

新規抗HIV薬の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために以下の研究に取り組んだ。

#### a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

未治療症例および既存の薬剤対して薬剤耐性を獲得した症例におけるIN領域の多様性について評価・解析し、それらの変異がIN阻害剤の感受性に及ぼす影響について検討を行う。

#### b. IN阻害剤の耐性機構の解析

HIVのINを分子標的とする新規薬剤ラルテグラビルが、2008年6月に国内で承認され、既存の薬剤ではウイルス複製が制御できない薬剤耐性症例でのウイルス抑制効果が期待されている。本研究では、IN内に誘導される薬剤耐性変異と共に、INの基質であるウイルスDNAの変異の可能性に着目して、HIVのラルテグラビル耐性獲得機構を明らかにする。

#### c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

酵素活性に基づいてHIV-1プロテアーゼの薬剤耐性をハイスループットに評価できる新規*in vitro*スクリーニングシステムを構築する。

### B. 研究方法

#### a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

インテグラーゼ(IN)阻害剤ラルテグラビル耐性獲得機序におけるウイルス側要因を明らかにするため、ラルテグラビル naïve 症例におけるIN遺伝子情報の収集を行う。抗HIV療法未投与症例群および既存の薬剤に対して耐性を獲得し、且つIN阻害剤 naïve な薬剤耐性症例群を解析の対象とした。INの有する遺伝的多様性がその後のラルテグラビルの治療効果に及ぼす影響について理解するために、IN内に複数の変異を(特に活性中心近傍に)獲得している感染者由来のINを組み込んだリコンビナント・ウイルスを作成し、ラルテグラビル耐性変異の導入による影響と*in vitro*での耐性誘導を行う。



## b. IN阻害剤の耐性機構の解析

計3例のラルテグラビル服用症例（名古屋医療センター 1例、国際医療センター 2例）を対象に、ラルテグラビル服用前の血漿検体を用いて、ベースラインとなる全長ウイルスゲノムRNAの塩基配列を決定した。具体的には、RT-nested PCR法にて、5'LTRからIN遺伝子を含む前半領域と、IN遺伝子から3'LTRを含む後半領域の2つの遺伝子断片を増幅し、増幅産物の塩基配列を決定した。ラルテグラビル耐性獲得機構を*in vitro*で調べるために、野生型の実験株NL4-3やラルテグラビル耐性を付与するN155H, Q148R/H/K変異を導入したNL4-3をラルテグラビル存在下で継代培養し、経時的なウイルスゲノム内の遺伝子変異の蓄積を解析することを計画した。この実験のために、N155H, Q148R/H/K変異を導入したNL4-3をsite-directed mutagenesis法にて作成した。

## c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

本研究におけるプロテアーゼ活性の検出原理を図1に示す。まず基質としてHIV-1 Gagタンパク質の内部切断部位p2-p7領域のN末端とC末端に、それぞれAlphaScreen ドナービーズとアクセプタービーズが結合するタグを融合させた人工基質を無細胞合成し、使用した。この基質が切断されずビーズ間距離が近接している場合はシグナルが得られるが（図1下）、プロテアーゼによって基質が切断されビーズ間の距離が離れた場合（図1上）、シグナルが低下することでプロテアーゼ活性を定量的に検出できる。本検出法と、HIV-1感染性分子クローンよりPCR法により転写鋳型を作成し無細胞合成したHIV-1プロテアーゼを用いて、薬剤耐性評価を行った。

## (倫理面への配慮)

薬剤耐性検査の実施に当たっては患者の同意を得ている。

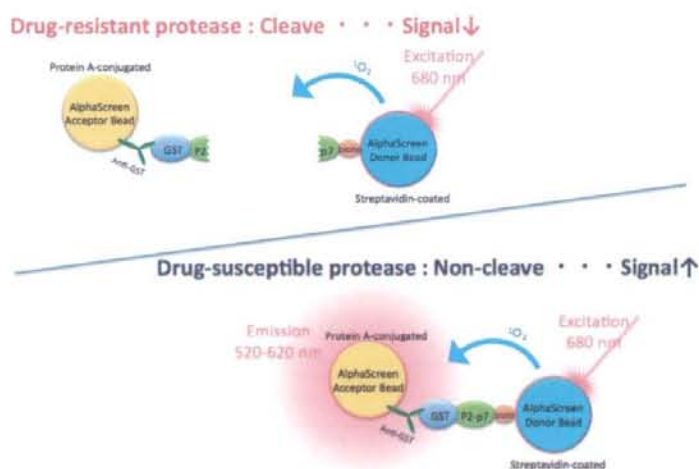


図1 AlphaScreenを用いたHIVプロテアーゼ活性検出法

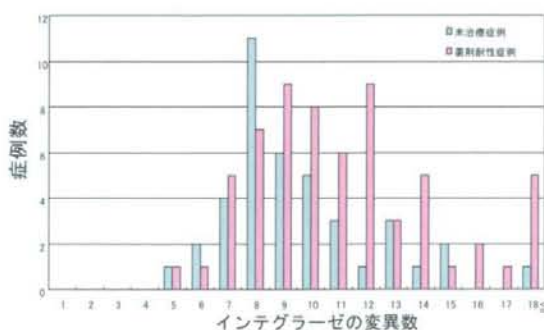


図2 インテグラーゼ領域の多様性

C. 研究結果

a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

未治療群40例と薬剤耐性群64例のIN領域の遺伝子配列解析を行った。その結果、薬剤耐性症例のほうにINの変異が多く集積している傾向が観察された(図2)。またラルテグラビル耐性変異に関してはQ148H、N155Hなどのラルテグラビルの感受性に強く影響する変異は認められなかったがE157Qが薬剤耐性群に2例観察された。一方、ラルテグラビル登場以前の実験的なIN阻害剤であるdiketo acid耐性に関連する変異が多数観察された。解析した症例の中でIN変異が最も多く観察された3症例のIN配列にラルテグラビル耐性変異Q148HとN155Hを導入したリコンビナント・ウイルスを作成した。

b. IN阻害剤の耐性機構の解析

3症例のいずれにおいても、ラルテグラビル服用前のIN内に既報のラルテグラビル耐性アミノ酸変異は存在しなかった。次に、INの基質である5'LTR末端と3'LTR末端の塩基配列をそれぞれ図1と図2に示した。5'LTR末端では、13塩基が保存されており、以降、若干の遺伝子変異を認めた(図3)。一方、3'LTR末端では、8塩基が保存されており、以降、5'LTR末端と比べより多くの遺伝子変異を認めた(図4)。N155H、Q148R/H/K変異を導入したNL4-3を発現させ、MT-4細胞に添加し、ウイルスの細胞変性効果を確認した。

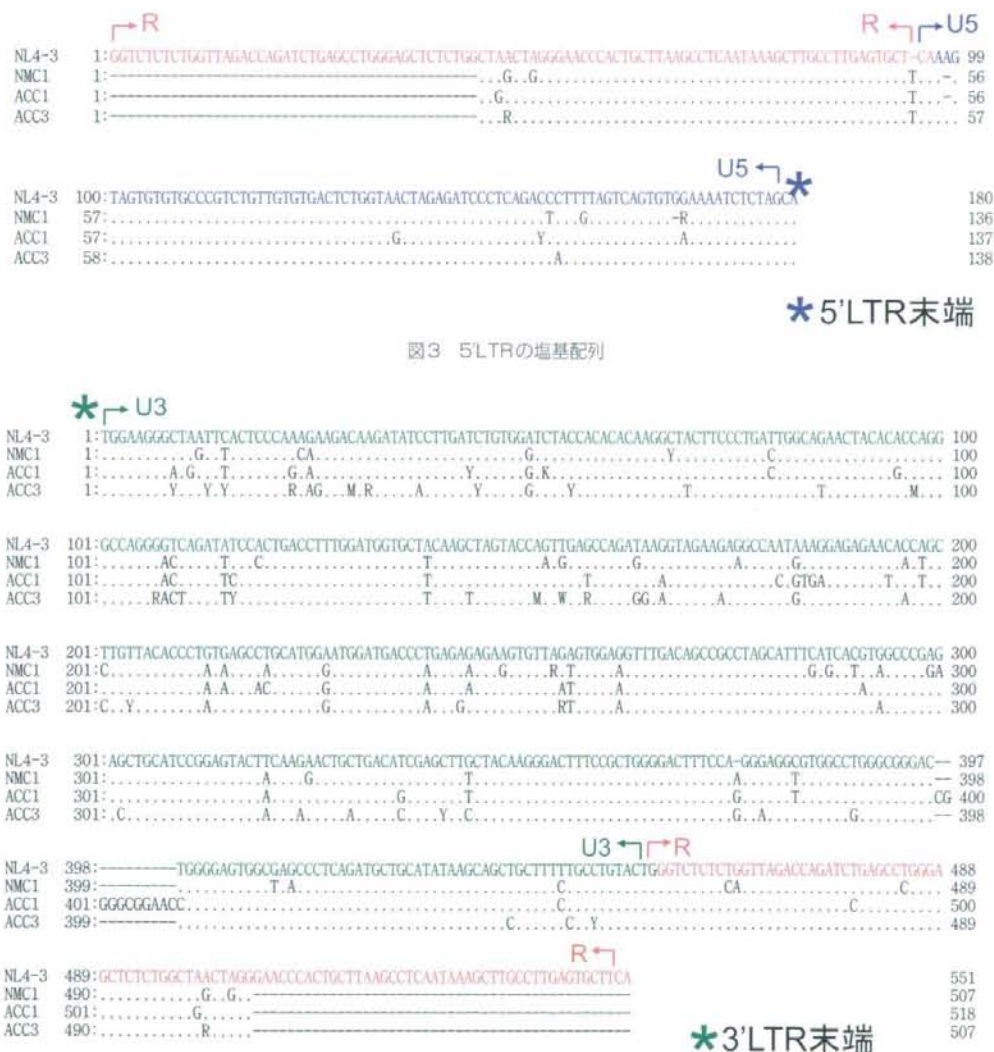


図4 3'LTRの塩基配列

### c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

図1における基礎的な反応至適条件を決定後に、まず7種類の感染性分子クローン由来プロテアーゼと、4種類のプロテアーゼ阻害剤を $IC_{50}$ 条件下で混合し、薬剤耐性の検討を行った。その結果、28サンプル中27サンプルについて遺伝子検査とよく一致することが認められた(図5)。さらに、各阻害剤濃度におけるプロテアーゼ活性を検討することで $IC_{50}$ を導き出す事に成功し(図6)、得られた $IC_{50}$ がウエスタンブロットによる検出結果と良く合致することが確認された。

### D. 考察

#### a. IN遺伝子の多様性の解析とそのウイルス抑制効果に対する効果の評価

INの遺伝子配列解析を行った結果、INが多様性に富む領域であることが明らかになった。INの構造は部分的にしか明らかにされていないが、今回に観察された変異のうち活性中心近傍に位置するものについては、構造学的にラルテグラビル耐性獲得に影響を及ぼす可能性も考えられ、今後臨床的および基礎的な視点両方からの詳細な解析が必要と思われる。

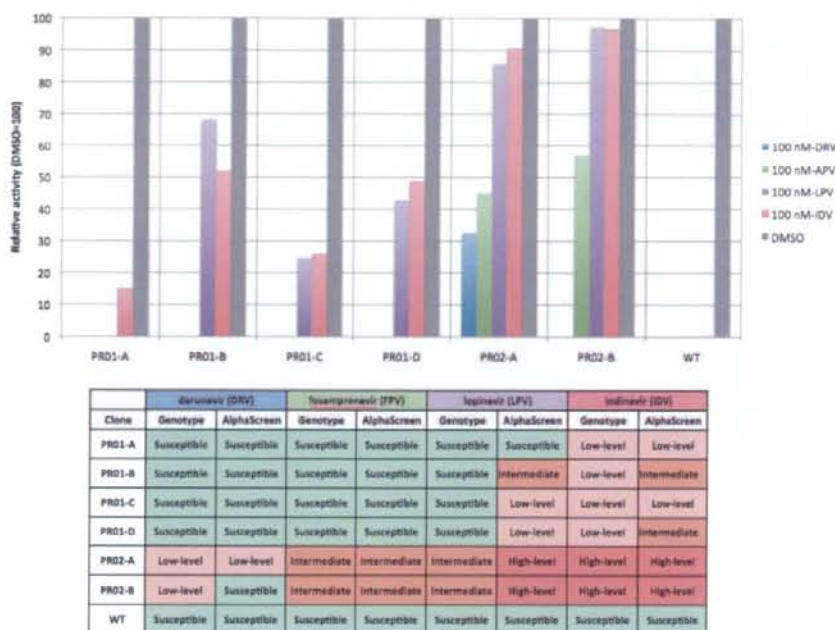


図5 AlphaScreen法を用いたHIVプロテアーゼ薬剤耐性評価

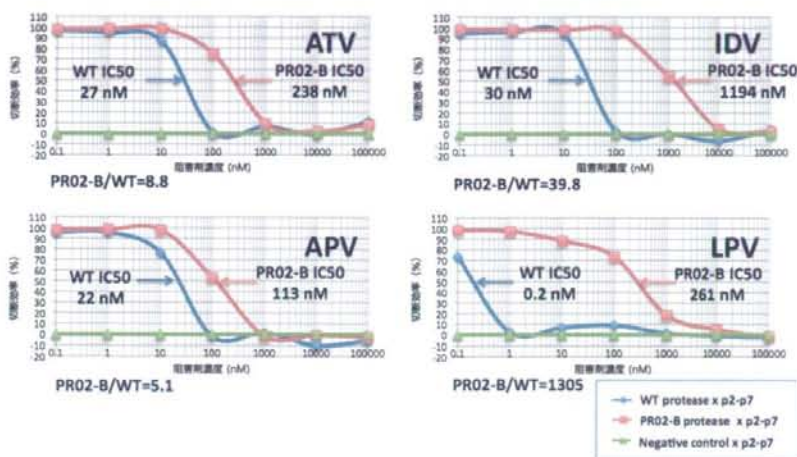


図6 AlphaScreenによる薬剤耐性プロファイリング

## b. IN阻害剤の耐性機構の解析

解析した3症例において、ラルテグラビル服用前にその耐性アミノ酸変異を認めなかった。この結果は、これら3症例が現在のラルテグラビルを含む多剤併用療法に対して良好な反応を示していることと合致する。INの基質である5'LTR末端と3'LTR末端は、それぞれ、13塩基、8塩基において完全に保存されていた。今後、ラルテグラビル耐性症例が生じた場合には、ラルテグラビル服用前後のウイルスゲノムを詳細に解析する計画である。ラルテグラビル耐性変異を有するNL4-3の作成し、ウイルス発現を確認した。今後、感染価の測定、ラルテグラビル感受性測定を順次実施し、継代培養実験へ移行する計画である。

## c. 無細胞反応系を応用したプロテアーゼ阻害剤感受性検査の確立と実用化

本手法では、コムギ無細胞系を用いることで、生化学的解析に十分量のプロテアーゼをハイスループットに調製し、未精製のままスクリーニングに用いることに成功しており、従来の*in vitro*アッセイ系と比較してより短時間で薬剤耐性を評価できるものと考えられる。さらに、遺伝子検査結果が類似したクローン間において、薬剤耐性に違いがみられたことから(図6)、耐性評価が困難であった変異蓄積型プロテアーゼに対しても、その耐性をよりの確に評価できるものと期待される。これらのことから本法は、プロテアーゼの実際の薬剤耐性を安全、簡便かつ正確に評価できるハイスループットスクリーニング系であり、加えて遺伝子検査法と並行して実施できることから、研究レベルのみならず、臨床検査における実用性も備えているものと期待される。

## E. 結論

IN阻害剤の耐性獲得に関わるウイルス側および宿主側因子について明らかにするために、未治療および既治療症例に対して薬剤耐性を獲得した症例の配列情報の収集を行った。

またラルテグラビル存在下でウイルスゲノムRNA内に蓄積する遺伝子変異をモニターする実験系を立ち上げた。これにより、今後、ラルテグラビル耐性症例が生じた場合に詳細な解析が可能となった。また、*in vitro*でラルテグラビル耐性獲得機構を研究するために必要なウイルスを作成した。さらに、我々はコムギ無細胞系を用いて、安全、簡便かつハイスループットにプロテアーゼ活性を検出する事の出来る新規薬剤耐性検査法の基盤技術の構築に成功した。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Deforche K, Camacho RJ, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Katzenstein DA, Harrigan PR, Kantor R, Shafer R, Vandamme AM: non-B Workgroup. Bayesian network analyses of resistance pathways against efavirenz and nevirapine. *AIDS*. 18;22(16):2107-15. Oct 2008
2. Furuya K, Omura M, Kudo S, Sugiura W, Azuma H.: Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol*. 2008 Jan;30(1):13-21.
3. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network.: Prevalence of drug resistance associated mutations in newly diagnosed HIV/AIDS patients in Japan from 2003-2007. *Antiviral Therapy*. 13(3):A162, 2008
4. Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.: Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses. *J Infect Dis*. Jan 1;197(1):134-41, 2008
5. Rajintha M, Bandaranayake, Moses Prabu-Jeyabalan, Junko Kakizawa, Wataru Sugiura, and Celia Schiffer. :Structural Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01\_AE Protease in Complex with the Subtype p1-p6. *Journal of Virology*, 82(13),2008

### 2. 学会発表

1. Junko Hattori, S Yoshida, H Gatanaga, M Kondo, K Sadamasu, T Shirasaka, H Mori, R Minami, W Sugiura, and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Network. Increasing Prevalence of Drug-resistance Mutations among Treatment-naïve HIV-infected Patients in Japan, 2003 to 2007
2. New Outbreak of HBV Genotype A in HIV-1-co-infected Cases in Japan. Seiichiro Fujisaki, Y Yokomaku, J Hattori, S Ibe, M Utsumi, M Hamaguchi, and W Sugiura
3. S Yoshida, H Gatanaga, T Itoh, M Fujino, M Kondo, K Sadamasu, T Kaneda, F Gejyo, T Shirasaka, H Mori, M Ueda, N Takata, R Minami, W Suigura and the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance