

c. IN阻害剤の耐性機構の解析

今回の検討では多様性がRAL耐性に及ぼす影響を確認できなかった。一方増殖能力についてはDR7026は明らかに野性株やDR1093よりも優れたRCを呈した(図4b)。また、MDSによるシミュレーションの結果もこれらの結果を支持するものであった(図5、表3)。

D. 考察

a. 逆転写酵素阻害剤耐性を簡便・迅速に評価できる新規*in vitro*アッセイ系の構築

本研究で構築したCFPAでは、コムギ無細胞系を用いることで、生化学的な解析に十分量のRTを簡便・迅速に合成し、未精製RTのまま酵素活性を検出することに成功しており、従来の*in vitro*アッセイ

表2：HIV-2 CRF01\_AB各クローンの薬剤感受性

NRTIs	FTC	3TC*	TFV	ABC*	ddl	d4T	AZT
NMC842	2.9	1.8	1.3	1.0	1.0	0.8	0.7
NMC842 RT <sub>M184V,D192N,R200K,D345N</sub>	>6153.8	>5031.4	0.7	6.2	2.6	0.8	0.7
NMC842 RT <sub>M184V</sub>	>6153.8	>5031.4	0.6	7.1	2.6	1.1	0.7
NMC842 RT <sub>D192N,R200K,D345N</sub>	3.7	3.2	0.7	1.5	1.4	0.6	1.0

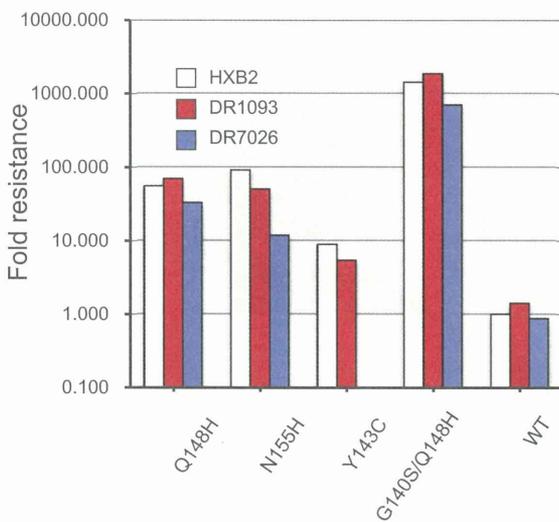
NNRTIs	EFV	ETV	NVP
NMC842	>16000.0	525.7	>339.0
NMC842 RT <sub>M184V</sub>	6319.0	222.6	>339.0
NMC842 RT <sub>D192N,R200K,D345N</sub>	4205.6	65.5	>339.0
NMC842 RT <sub>M184V,D192N,R200K,D345N</sub>	3754.0	62.4	>339.0

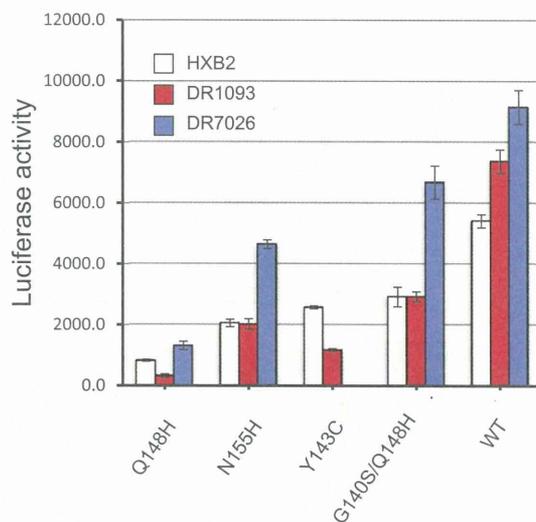
PIs	APV	ATV	DRV	TPV	NFV	IDV	LPV*	SQV
NMC842	97.8	13.9	7.7	3.7	3.2	3.0	2.6	1.2
NMC842 PR <sub>R70K</sub>	69.7	7.6	4.6	2.5	2.8	1.9	2.1	0.9

INI	RAL*
NMC842	3.3
NMC842 IN <sub>V133I</sub>	4.3



(a) RAL耐性レベルの評価



(b) RAL耐性株のRC

図4：RAL耐性およびRCにIN活性中心近傍の多様性が及ぼす影響

系と比較してより簡便かつ短時間で薬剤耐性を評価することができると考えられる。CFPAと遺伝子型検査法の結果の乖離が確認できた2サンプルについて、複数の変異の集積による耐性の影響の有無について、ウイルス学的な感受性検査法を用いて、より詳細な解析を行い、その原因を追求する計画である。

## b. HIV-2 薬剤耐性の解析

本研究により、未解明であったHIV-2 CRF01\_AB株の薬剤感受性プロファイルを初めて同定し、有効な薬剤を選択して多剤併用療法を施行することが可能となった。今後は、実際に多剤併用療法を施行したHIV-2 CRF01\_AB感染例のウイルス学的治療効果と免疫学的治療効果を評価していく予定である。

## c. IN阻害剤の耐性機構の解析

インテグラーゼ内のY143C、Q140S+G140HそしてN155Hと変異はRAL耐性主要変異の典型例であり、今回にR5-MaRBLEによる感受性の結果は従来の知見とよく合致したものであった。これらの変異による耐性レベルは極めて高いため、近傍の多様性変異の影響は誤差範囲程度と考えられた。一方、RCで野性株、DR1093、DR7026の3株で明確な差があり、これらの株はインテグラーゼ以外の領域は共通する事からインテグラーゼにおける多様性変異が影響しているものと考えられた。多様性の影響をより詳細に理解するためには実際にRAL耐性を獲得した症例において、獲得耐性パターンと多様性の関連について検討すべきと思われた。

表3：RAL耐性変異株とRAL結合親和性のMDSによる解析

	WT	148H	155H	140S/148H	143C
HXB2	-	+31.5	+35.6	+36.6	+4.4
1093	-	+36.8	+37.9	+43.5	+3.8
7026	-	+33.9	+37.7	+37.3	+5.1

The more positive energy indicates the lower affinity of RLT-Mg<sup>2+</sup> with IN.

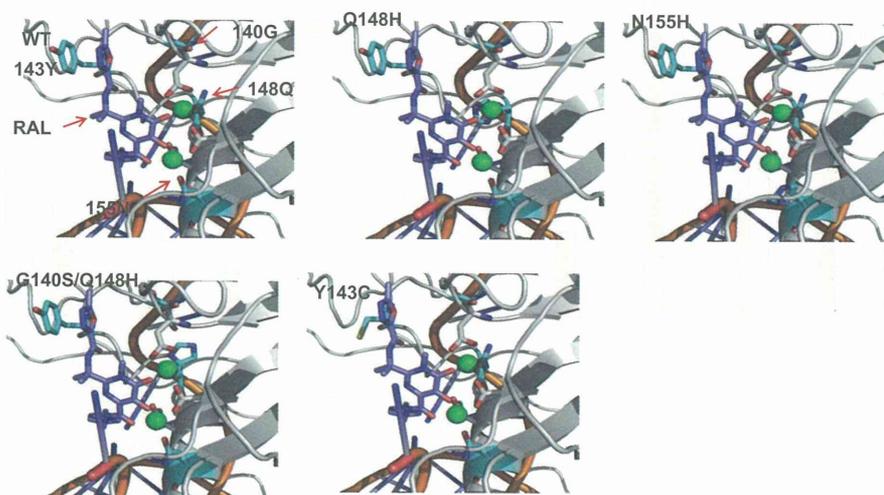


図5：RAL耐性変異株とRAL結合親和性のMDSによる解析

## E. 結論

コムギ無細胞系を用いた新規逆転写酵素阻害剤耐性検査法の妥当性について既存の感受性検査法、遺伝子検査評価アルゴリズムとの比較検討を行い、高い一致率を示す事を確認した。HIV-2の薬剤耐性症例の解析を行い、責任変異を確認した。IN阻害剤耐性に近傍の多様性が及ぼす影響について解析し、薬剤耐性レベルよりもウイルス増殖能力に影響する事を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1)原著論文による発表

- 1) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Lack of Correlation Between UGT1A1\*6, \*28 Genotypes, and Plasma Raltegravir Concentrations in Japanese HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 2) Revell AD, Wang D, Boyd MA, Emery S, Pozniak AL, De Wolf F, Harrigan R, Montaner JS, Lane C, Larder BA; RDI Study Group\*. The development of an expert system to predict virological response to HIV therapy as part of an online treatment support tool. *AIDS*. 2011 Sep 24;25(15):1855-63. (\* RDI Study Groupのメンバとして参加)
- 3) Yotsumoto M, Shinozawa K, Yamamoto Y, Sugiura W, Miura T, Fukutake K. Mutations to the probe of Cobas TaqMan HIV-1 ver. 1.0 assay causing undetectable viral load in a patient with acute HIV-1 infection. *J Infect Chemother*. [Epub ahead of print]
- 4) Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H. Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. *PLoS One*. 6(4):e18630, 2011.
- 5) Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse transcriptase inhibitor-resistant mutations. *Future Microbiol*. 6(3):295-315, 2011.
- 6) Junko Shibata, Wataru Sugiura, Hirotaka Odee, Yasumasa Iwatani, Hironori Sato, Hsinyi Tsang, Masakazu Matsuda Naoki Hasegawa, Fengrong Ren and Hiroshi Tanaka. Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30 N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case: *Antivir. Res*. 90(1):33-41, 2011.
- 7) Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol*. 49(3):1017-24, 2011.

### 2) 口頭発表

#### (国際学会)

- 1) Miyazaki N, Fujii T, Iwamoto A, Matsushita S, Sugiura W. Potential of recent antiretroviral treatments in controlling treatment-naive and drug-resistant HIV cases in Japan. *International Workshop on HIV& Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies*. (Mexico) 2011.6
- 2) Sugiura W. Effects of HIV integrase polymorphisms on raltegravir-resistance susceptibility. *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis Treatment and Prevention*. (ROME,ITALY) 2011.7
- 3) Hattori J, Shao W, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Yokomaku Y, Iwatani Y, Maldarelli F, Sugiura W. Molecular epidemiology of transmitted drug-resistant HIV among newly diagnosed individuals in Japan. *6th International Workshop on HIV Transmission Principles of Intervention* (ROME,ITALY)2011.7
- 4) Hattori J, Shigemi U, Hosaka M, Okazaki R, Sugiura W. Characteristics of Drug-Resistant HIV-1 Transmission: Analysis of Drug Resistance in Recently and Not-Recently Infected Treatment-Naive Patients in Japan. *XV International Congress of Virology* (札幌) 2011.9
- 5) Ibe S, Masaoka T, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W. Identification of novel drug-resistance mutations selected during abacavir+lamivudine+lopinavir/r therapy in HIV-2 CRF01\_AB infection. *XV International Congress of Virology* (札幌) 2011.9
- 6) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W. Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. *Protein Island Matsuyama International Symposium 2011* (愛媛・松山)2011.9
- 7) Ibe S, Yokomaku Y, Maejima M, Iwatani Y, Sugiura W. Drug-resistance profiles of HIV-2 CRF01\_AB-infected case during abacavir + lamivudine+lopinavir/r therapy. *6th German- Japanese HIV Symposium* (Bochum, Germany) 2011, 10
- 8) Suzuki K, Ode H, Fujino M, Kimura Y, Masaoka T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Suzuki A, Watanabe N, Sugiura W. Enzymatic and Structural Analyses of DRV-resistant HIV-1 Protease. *The 12th SADR* (Hershey, Pennsylvania, USA) 2011.11

#### 国内学会

- 1) 伊部史朗、横幕能行、服部純子、杉浦 互：抗レトロウイルス治療中のHIV-2CRF01\_AB感染症例に認めた薬剤耐性変異。第85回日本感染症学会総会（東京）2011年4月
- 2) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉

- 浦 互：新規HIV/AIDS診断症例におけるトロピズムに関する検討. 第85回日本感染症学会総会(東京) 2011年4月
- 3) 平野 淳、池村健治、横幕能行、杉浦 互：ラルテグラビル投与に伴う副作用発現並びに遺伝子多型と血中濃度に関する検討. 第85回日本感染症学会総会(東京) 2011年4月
  - 4) 伊部史朗、正岡崇志、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互：抗レトロウイルス療法中のHIV-2CRF01\_AB感染例に認めた薬剤耐性変異 第13回白馬シンポジウムin札幌-最先端のエイズ研究を徹底討論する-(札幌) 2011年5月
  - 5) 岩谷靖雅：HIVの逆転写・複製機構とAPOBEC3による抑制機序 第13回白馬シンポジウムin札幌-最先端のエイズ研究を徹底討論する-(札幌) 2011年5月
  - 6) 杉浦 互：～難治性疾患の治療にむけて～「HIV/AIDS治療の現状とこれからの課題」第3回富山ライフサイエンスシンポジウム(富山) 2011年7月
  - 7) 松永智子、澤崎達也、小島良績、森下了、佐藤裕徳、大出裕高、古川亜矢子、片平正人、杉浦互、梁明秀：コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたXenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) プロテアーゼの解析日本ヒトプロテオーム機構第9回大会(新潟) 2011年7月
  - 8) 横幕能行、鈴木奈緒子、杉浦 互：医療現場におけるHIV暴露事故への対策と課題第65回国立病院総合医学会(岡山) 2011年10月
  - 9) 杉浦 互：インテグラーゼ阻害剤の臨床における耐性発現の実際. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 10) 杉浦 互：HIV薬剤耐性検査と耐性HIVの現状. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 11) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：HIV-1 Vif感受性に関するAPOBEC3C/Fのアミノ酸残基の同定. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 12) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、岩谷靖雅、横幕能行、杉浦 互：ウエスタンブロット法によりHIV-1/HIV-2重複感染が疑われた症例の精査解析. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 13) 岩谷靖雅、北村慎吾、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、杉浦 互：HIV-1 NCは逆転写開始反応を促進する 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 14) 田中勇悦、児玉 晃、西澤雅子、杉浦 互、田中礼子：CXCR4架橋によるCXCR4およびCCR5親和性HIV-1の感染制御. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 15) 服部純子、椎野禎一郎、湯永博之、林田庸総、吉田 繁、千葉仁志、小池隆夫、佐々木悟、伊藤俊広、内田和江、原 孝、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、近藤真規子、長島真美、貞升健志、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、加藤真吾、藤井 毅、岩本愛吉、西澤雅子、岡 慎一、伊部史朗、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、渡辺香奈子、渡邊 大、白坂琢磨、小島洋子、森 治代、中桐逸博、藤井輝久、高田昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦 互：新規HIV/AIDS診断症例における薬剤耐性HIVの動向. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 16) 椎野禎一郎、服部純子、湯永博之、吉田 繁、伊藤俊広、上田敦久、近藤真規子、貞升健志、藤井 毅、横幕能行、上田幹夫、田邊嘉也、渡邊大、森 治代、藤井輝久、南 留美、健山正男、杉浦 互：日本薬剤耐性HIV調査研究グループ国内感染集団の大規模塩基配列解析2: Subtype Bの動向と微少系統群の同定. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 17) 片野晴隆、横幕能行、菅野隆行、福本 瞳、中山智之、新ヶ江章友、杉浦 互、市川誠一、安岡彰：日本人MSMにおけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(KSHV/HHV-8)抗体保有率について. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 18) 渡邊綱正、横幕能行、今村淳治、杉浦 互、田中靖人：HBV新規感染におけるHIV重感染の影響についての検討. 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 19) 吉田 繁、伊部史朗、服部純子、松田昌和、橋本修、岡田清美、和山行正、巽 正志、杉浦 互：HIV薬剤耐性検査の外部精度管理 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 20) 西澤雅子、Johnson Jeffrey、Heneine Walid、杉浦 互：定量PCRを応用した高感度薬剤耐性検査法による抗HIV治療患者からの微少集簇薬剤耐性変異検出の試み 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 21) 今村淳治、横幕能行、服部純子、岩谷靖雅、杉浦 互：薬剤耐性変異を認めた新規未治療HIV/AIDS症例の治療と予後の検討 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日
  - 22) 柴田雅章、福島直子、高橋昌明、野村敏治、今村淳治、横幕能行、杉浦 互：リトナビルソフトカプセルから錠剤への切り替えに伴うダルナビル血中濃度の変化に関する検討 第25回日本エイズ学会学術集会・総会(東京) 2011年11月30日～12月2日

- 23) 大久保奈美、高橋昌明、木下枝里、柴田雅章、福島直子、野村敏治、泉田真生、今村淳治、横幕能行、杉浦互：抗結核薬リファンピシンが中止となった患者のラルグラビル（RAL）の血中濃度推移をみた一症例 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 24) 横幕能行、鬼頭優美子、今村淳治、大出裕高、服部純子、伊部史朗、岩谷靖雅、杉浦互：HIVプロテアーゼ表現型検査法であるVLP ELISA法の実臨床への応用 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 25) 福島直子、柴田雅章、木下枝里、大久保奈美、高橋昌明、野村敏治、横幕能行、杉浦互：薬剤師のためのHIV研修会開催に関するアンケート調査について 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 26) 桑原 健、矢倉裕輝、吉野宗宏、上平朝子、白坂琢磨、杉浦互：エトラビルン、ダルナビル、ラルテグラビルの血中トラフ値と海外データとの比較 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 27) 丸山笑里佳、横幕能行、松岡亜由子、服部純子、杉浦互：服薬アドヒアランスの低さに関連する要因の検討 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 28) 松下修三、杉浦互：「マラビロク、どう使う？」 第25回日本エイズ学会学術集会・総会（東京）2011年11月30日～12月2日
- 29) Matsuoka K, Masaoka T, Tanabe F, Morishita R, Sawasaki T, Iwatani Y, Sugiura W: Development of in vitro enzymatic method for assessing susceptibility to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors using a wheat-germ cell-free translation system. 第34回日本分子生物学会年会（横浜）2011年12月13日～16日
- 30) 北村紳悟、中島雅晶、大出裕高、前島雅美、伊部史朗、横幕能行、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦互、岩谷靖雅：Structure-Guided Mutagenesis を用いたAPOBEC3C/F の HIV-1 Vif 感受性に関するアミノ酸残基の同定 第34回日本分子生物学会年会（横浜）2011年12月13日～16日

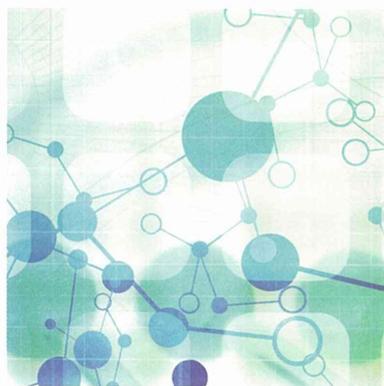
#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

## 侵入阻害薬に対する耐性機構の解明

研究分担者

吉村 和久 熊本大学エイズ学研究センター吉村プロジェクト研究室 准教授



### 研究要旨

前年度までの厚生労働科研究費エイズ対策研究事業（平成21～23年度「抗HIV薬適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究（潟永）班」）で、subtype B（Y1）及びnon-B subtypeの臨床分離株（K1；CRF08\_BCとY2；subtype C）を用いて、MVCに対する*in vitro*耐性誘導を行い、耐性機序の検討を行った。その結果、MVCに対する耐性の獲得は、i) 低CCR5発現状態への馴化と、ii) MVC結合CCR5への対応という2段階のステップで行われていることが判明した。

この成果をふまえ、今年度はY1（subtype B）ウイルスの低CCR5発現細胞への馴化ウイルスとMVC高度耐性ウイルスのEnv組換えウイルスを作製し、より詳細にgp120の変異とMVC耐性の関連性を調べた。また、抗Env中和単クローン抗体（抗V3抗体）に対する感受性の変化も調べた。その結果、MVC耐性変異獲得により、抗V3単クローン中和抗体への感受性を著明に上昇させるような変化をgp120の立体構造に付与していることが確認できた。

### A. 研究目的

この研究班の柱である「安全かつ効果的な抗HIV療法」を知る上において、新規の作用点を持つ薬剤（coreceptor結合阻害剤）の耐性変異に関する研究は、今後ますます重要となると考える。そこで、前研究班（平成21～23年度「抗HIV薬適正使用と効果・毒性に関する基礎的研究（潟永）班」）で誘導を行ったsubtype B臨床分離株（Y1）を用いて組換えウイルスを作製し、MVCのみならず、抗V3中和単クローン抗体に対する感受性の変化を調べた。また、CCR5阻害剤耐性獲得のメカニズムにより踏み込むため、細胞表面のCCR5発現量の少ない細胞へのウイルスの馴化が、MVCの感受性に及ぼす影響も合わせて検討した。

### B. 研究方法

R5ウイルスの耐性ウイルス誘導を行うため、CCR5高発現T細胞株であるPM1/CCR5細胞と親細胞株であるPM1細胞（CCR5発現量がPM1/CCR5細胞に比較して非常に低い）を用い*in vitro* R5ウイルスのMVCに対する耐性誘導を試み、得られたそれ

ぞれの継代ウイルスを用いて、MVCに対する耐性度をPM1/CCR5細胞を用いたWST-8 assay（細胞傷害阻止試験）により判定した。Y1を用いたMVC耐性ウイルス誘導は、前年度途中までだったので、今年度はそれを完成させた（48パッセージ、10 $\mu$ M）。R5ウイルスを用いたWST-8 assayはこれまであまり行われていないが、R5ウイルスの実験室株や臨床分離株においても、WST-8 assayでの測定が可能であることは、既に確認済みであり、従来に比べて簡易にウイルスの薬剤や抗体に対する感受性を判定できるため、非常に有用である。WST-8 assayにより逃避ウイルスの誘導が確認できたところで、これらのウイルスのenvelopeのシークエンスを行い、耐性能付与責任変異部位を特定した。得られた変異部位を、以前行ったsubtype C（Y2）ウイルスの耐性変異部位と比較検討した。

また、Y1ウイルスのMVC耐性変異を持つEnvをpNL43ベースのplasmidに組み込み、感染性クローンウイルスを作製した。そして、PM1細胞により継代した低CCR5発現細胞への馴化ウイルスやコントロールのEnvとMVC感受性の比較を行った。また、抗Env中和抗体への感受性の違いも、組み替えウイ

ルスを用いて調べた。

### (倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり該当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。

## C. 研究結果

今回用いたR5臨床分離株Y1は、近年 hemophilia の症例から分離された臨床株で、gp120のシークエンスの結果、従来報告されてきた典型的なサブタイプB株であった。このウイルス株は、日本におけるHIV-1の中で最も多くの感染者が存在するタイプである。MVCの濃度を1 nMから開始し、徐々に上げて行き最終的には10 $\mu$ Mまで到達した(48パッセージ)。一方CCR5低発現細胞であるPM1細胞に継代していたウイルスは、14パッセージまでは、MVC存在下のウイルスと同様の耐性度(IC<sub>50</sub>:100-200nM)を示していた。その後は同程度の耐性度のまま、最後まで続いた。このことは、低CCR5細胞へのウイルスの馴化により、中程度のMVCへの耐性を獲得したことを示している。

次に、それぞれのパッセージのシークエンスを比較した結果、MVC耐性誘導ウイルスとPM1細胞への低CCR5馴化ウイルスのどちらとも、はじめに可変領域の選択が起こることが分かった(V1、V3、V5、図1A)。これは、スタート時点でクワシスピーシスとして存在しているウイルス集団の中から選択された結果と考えられる。この現象は、subtype C (Y2)の耐性誘導の時にも同様に観察された(表1)。PM1細胞におけるパッセージウイルスとIC<sub>50</sub>の差が開き始めた17パッセージ以降は、C2とC4に新たな変異の獲得が認められた(V200IとM434I)。41パッセージ以降はV3(K305R)に新しい変異が確認され、それとともにウイルス抑制試験における最大抑制濃度のプラトーの位置が低下していった(図1B)。PM1におけるパッセージウイルスとの比較で両者の最も異なる点は、高度MVC耐性誘導ウイルスが、gp120のCCR5のN端結合部位に集中的に耐性変異を獲得するのに対して、PM1馴化ウイルスは、ほとんど見られないということである(図1)。また、PM1細胞馴化ウイルスのほとんどの変異がベースラインウイルスに存在する中からの選択であるのに対し、MVC高度耐性ウイルスは新規の変異獲得が必要であるという違いも見られた。このような傾向は、サ

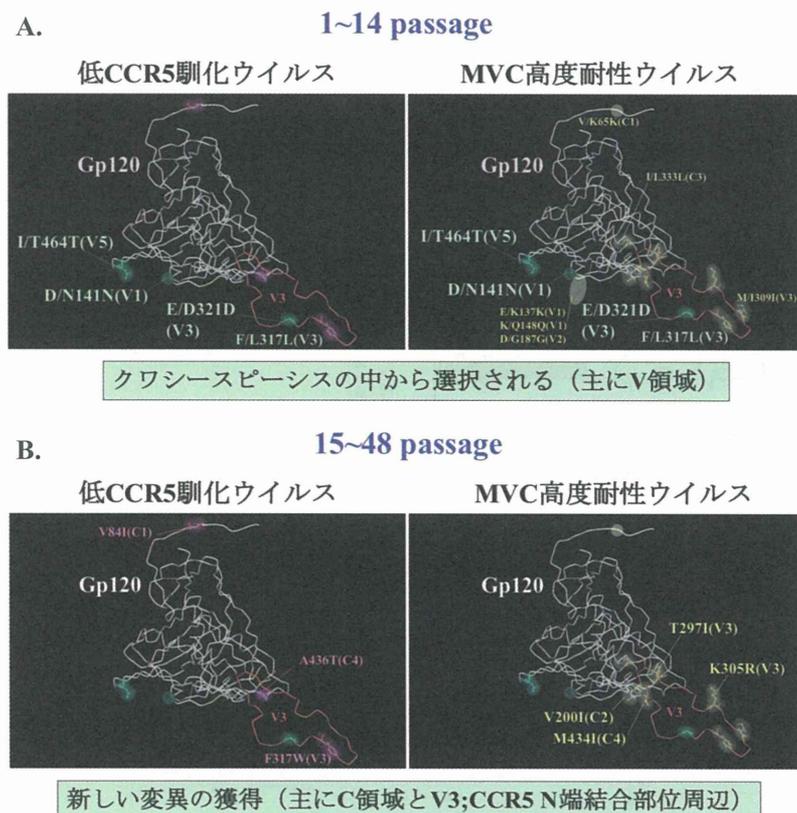


図1：低CCR5馴化ウイルスとMVC高度耐性ウイルスのアミノ酸変異部位の比較 (Subtype B)

ブタイプの異なる臨床分離株 (subtype C, Y2) を用いた時も同じように認められた (表1)。

また、MVC高度耐性ウイルスが抗Env中和抗体 (抗V3抗体) に感受性になることが確認できたので、耐性変異Envを持つ組み替えウイルスを作製し、確認を行った。その結果、MVC耐性変異クローンウイルスは、コントロールウイルスのEnvを組換えたクローンウイルスに比較して、著明な感受性の増強を認めた (図2)。

### D. 考察

Subtype Cウイルスで得られた結果と比較して、subtype Bにおいても、MVCへの耐性獲得の道筋として、CCR5低発現への馴化がまず優先され、その後MVCへの耐性変異の獲得へと進んでいくという、

two-stepの変異であることが分かった。また、どちらのサブタイプウイルスにおいても、MVCに対する高度耐性の獲得には、Envの305番目 (V3) のアミノ酸の変異が必須であることも今回確認できた。

また、今回新たに作製した耐性Envを持つ組換えウイルスのアッセイの結果から、MVCに高度耐性を付与するEnvの変異がenvelopeの立体構造を変化させて、特にV3に対する中和抗体のアクセスを良くすることが示唆された。このことは、血中抗体価が高い患者にMVCを使用することで耐性変異株の出現を抑制できる可能性を示唆している。

今後、MVC治療によるEnvの変異が自己の中和抗体の感受性に与える影響を調べていきたいと考えている。

表1：MVC高度耐性ウイルスと低CCR5馴化ウイルスのアミノ酸変異部位の比較

Subtype B		HIV-1 <sub>Y1</sub>													
	Passage #	SP	C1		V1		C2		V3		C3	V4	C4		V5
Base line virus	0	R W	V/K V	E/K D/N	K/Q V T	K I F/L	D	I/L	T/-	M A	A	I/T			463
PC	48	K C	V V	E/K D/N	K/Q V T	K M F	E/D	I	-	M A	A	I/T			463
MVC (10000nM)	48	R W	K V	K N Q	I I R	J L	D	L	T	I A	T			463	
PM1-PC	48	R W	V I	E N	K V T	K M I	W	D	L	-	M I	T			463

Subtype C		HIV-1 <sub>Z</sub>														
	Passage #	C1			V1		C2		V3		V4		C4		V5	
Base line virus	0	V R M	E/D	I/M/V	L	E G Y/H	N L	D/-	D/I	N/-	V G	G/S	D/-	N/-		
PC	77	V R M	E W	L	E G Y	N L	-	I	-	V G	G D	N				
MVC (10000nM)	77	I K I	D M V	Q D H	K L	D D N	I R S									
PM1-PC	71	V R M	D M L	E D H	N I	D D N	V G	G D	N							

- : 低CCR5馴化とMVC耐性誘導ウイルスの両方にみられる変異
- : MVC耐性誘導ウイルスのみにみられる変異
- : MPI (Maximum Percent Inhibition)の低下に関与する変異

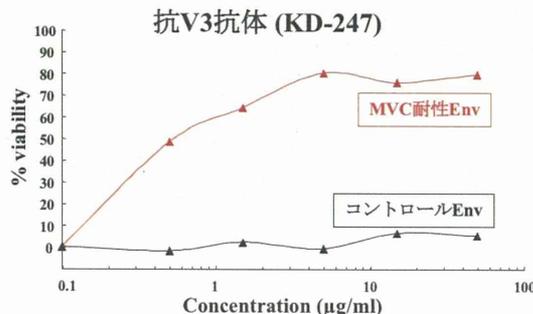
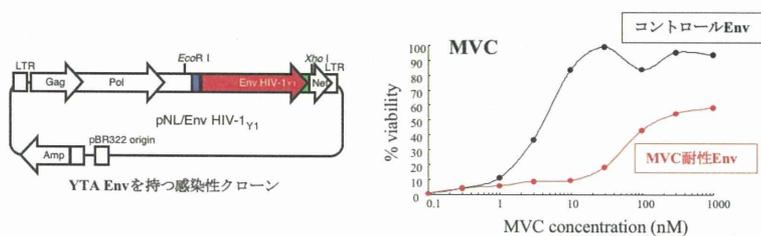


図2：MVC感受性及び耐性Envを持つ感染性クローンの抗V3中和抗体に対する感受性の比較

## E. 結論

臨床分離ウイルス株を用いた *in vitro* における MVC の耐性誘導の結果、異なる subtype 間においても、共通して認められる変異の道筋があることが確認できた。また、高度 MVC 耐性変異 Env をもつ組換えウイルスが、それまで全く反応しなかった抗 V3 中和抗体に感受性になることが確認できた。組換えウイルスを用いたより詳細な検討を、今後も行っていく予定である。

## F. 研究発表

- 1) Maeda, Y., Yoshimura, K., Kodama, E., Miyamoto, F., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. Acquisition of resistance to HIV-1 entry inhibitors *in vitro* and *in vivo*. *J AIDS & Clinical Research*, in press, 2012.
- 2) Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19:6735-6742, 2011.

## 学会発表

### 海外

- 1) Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the *in vitro* selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- 2) Harada S., Ishikawa T., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences *in vitro*. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2011, 10. 19-21.
- 3) Yoshimura K., Harada S., Hamji A., Matsushita S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced *in vitro* selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Roma, Italy, 2011, 7. 17-20.

### 国内

- 1) 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三：臨床分離 HIV を用いたマラビロック (MVC) 耐性誘導のメカニズムの解析 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 2010.11.30-12.2 東京
- 2) 原田恵嘉、濱治有希、遊佐敬介、松下修三、吉村和久：抗 HIV 剤が Env 多様性に与える影響 第25回日本エイズ学会学術集会・総会 2010.11.30-12.2 東京
- 3) 吉村和久：CCR5 阻害剤がエンベロープ三量体

形成に及ぼす影響 第13回白馬シンポジウム  
2011, 5. 19-20 北海道

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

## 抗HIV薬の感染予防効果の解析

研究分担者

川村 龍吉 山梨大学医学部附属病院皮膚科 講師

### 研究要旨

世界における新たなHIV感染者数は現在でも年間約250万人に上り、そのほとんどが性行為による感染である。HIVの世界的流行を阻止すべく、性行為HIV感染を予防する新たな薬剤（マイクロビサイド）の開発が世界中で精力的に行われている。今回の我々の研究結果から、新規HIV治療薬であるマラビロック（MVC）を最低3日間内服することによって、性行為HIV感染が予防できる可能性が示唆された。また、この感染抑制の機序として、内服後に同剤が速やかに表皮内に到達し、HIV生体内侵入時の重要な感染ターゲットである表皮内ランゲルハンス細胞上のCCR5に結合することで感染抵抗性を獲得すると考えられた。

### A. 研究目的

HIV感染症は世界で毎年約250万人もの新規感染者が発生しており、その約90%が性行為による感染である。2006年のAIDS国際会議において、ビル・ゲイツ夫妻が「HIV侵入阻害外用剤（マイクロビサイド）の開発など、コンドーム以外の方法で性行為HIV感染を防ぐ手段を確立することが緊急課題だ」と講演したが、世界的なHIVの流行を阻止すべく、新たなマイクロビサイドの開発が全世界で精力的に推し進められてきた。一昨年までに11種類のマイクロビサイド（PRO2000、Carraguard、cellulose sulfate、BufferGel、C31Gなど）の臨床試験が終了したが、残念なことにいずれのマイクロビサイドも有意に性行為HIV感染を抑制することができず、むしろ感染を助長してしまうというものもあった。しかし最近、ついに抗HIV薬Tenofovirゲルの性行為前の膈内外用によって性行為HIV感染が約40%予防できるという臨床試験結果が報告された（Karim QA et al. *Science* 329:1168-1174, 2010）。一方、Tenofovirと同じNRTI（核酸系逆転写酵素阻害薬）である新規抗HIV薬：EFdAは、*in vitro*のHIV感染抑制実験において、Tenofovirに比べて格段に優れた感染抑制効果を持つことが明らかとなっている（Nakata H et al. *J Virol* 51: 2701-2708, 2007）。本研究の目的は、*ex vivo*経皮

膚HIV感染モデルを用いてEFdAとTenofovirの侵入阻害効果を比較検討し、EFdAが性行為HIV感染における新たなHIV侵入予防薬（マイクロビサイド）として臨床応用可能であるかを検討することにある。

### B. 研究方法

近年、異性間性行為におけるHIVの生体内メカニズムとして、「HIVは皮膚・粘膜表皮内ランゲルハンス細胞（以下LC）の感染を介して生体内に侵入する」というこれまで我々が提唱してきた仮説が世界的に認められつつある（Kawamura T et al. *J Exp Med* 192:1491-1500. 2000, *Eur J Immunol* 31:360-368. 2001, *P.N.A.S.* 100:8401-8406. 2003, *J Immunol* 180:5:3297-304. 2008, Ogawa Y and Kawamura T et al. *Blood* 21;113:5157-66. 2009）。また我々は、表皮水疱蓋を用いた新規*ex vivo*経皮膚HIV感染モデルを確立し、抗HIV薬の経皮膚感染抑制効果をスクリーニングする新たな手法を開発した（Kawamura T et al. *J Virol* 78: 7602-7609. 2004）。本研究では、このモデルを用いて、EFdA、Tenofovirおよび新規CCR5阻害剤：マラビロック（MVC）などの抗HIV薬の*ex vivo*でのHIV感染阻害効果を比較検討する。まず、健常ボランティアから皮膚（表皮）を表皮水疱蓋として採取する。あらかじめ24穴プレート上に置いて

あるEFdA、TenofovirおよびMVC各薬剤ドロップ（50μL；100-5000nM）の上に、角質側を下にした表皮シートをのせる。30分後に各々の表皮にHIV（HIVBaL; R5 HIV）ドロップ（50μL；10,000 TCID50 final）を曝露する。2時間後表皮シートを3回PBSにて洗浄し、培養液に浮かべる。HIV曝露3日後に表皮シートから遊走した細胞（skin emigrants; 90%以上がLC）を回収し、skin emigrantsをPE標識抗 langerin抗体およびAPC標識抗CD11c抗体（LCマーカー）で染色後、FITC標識抗HIVp24抗体で intracellular stainingし、フローサイトメトリーにてLCのHIV感染率を解析する。さらに、同一ボランティアから得た末梢血よりCD4陽性T細胞を調整し、skin emigrantsと共培養し（skin emigrants : CD4<sup>+</sup> T cells = 1 : 100）、培養上製のHIVp24をELISAにて定量し、CD4陽性T細胞からのHIV産生量、すなわちHIV感染LCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能を比較検討した。

上記の実験において、各種抗HIV薬を30分間曝露後、6時間の間隔をあけてHIVを曝露することによって、各種抗HIV薬の薬効持続時間についても比較検討した。

**(倫理面への配慮)**

健常ボランティアから採取した皮膚を用いる研究は山梨大学倫理委員会の了承を得ている（承認番号598）。本研究において用いられる皮膚（表皮）は、ボランティア本人のインフォームドコンセントを得てから使用している。また、ヒト皮膚を用いた ex vivo HIV感染に関しても、同倫理委員会の了承を得

ている（承認番号：237）。

**C. 研究結果**

図1に示す如く、EFdA、TenofovirおよびMVCの各薬剤の前処置は、100-5000nMのそれぞれの濃度において、表皮内LCのHIV感染を有意に抑制した。驚くべきことに、EFdAによるLCのHIV感染抑制効果はいずれの濃度においても最も強く、ほぼ100%の抑制効果が得られた。

また、図2に示す如く、各種抗HIV薬を曝露後、6時間の間隔をあけてHIV曝露した実験においても、EFdAによるLCのHIV感染抑制効果が最も強く、ほぼ100%の抑制効果が得られた。

さらに、図3Aに示す如く、EFdA、TenofovirおよびMVCの各薬剤（1000nM）の前処置は、HIV感染LCからCD4陽性T細胞へのウイルス播種を有意に抑制した。EFdAによるHIV感染LCからのウイルス播種抑制効果は最も強く、ほぼ100%の抑制効果が得られた。また、図3Bに示す如く、各種抗HIV薬を曝露後に6時間の間隔をあけてHIV曝露したHIV感染LCからのウイルス播種抑制効果もEFdAが最も強く、100%の抑制効果が維持された。

**D. 考察**

前述の如く、抗HIV薬Tenofovirゲルによる性行為HIV感染予防効果は約40%であった。今回の研究結果は、新規抗HIV薬EFdAがLCの ex vivo HIV感染抑制実験において、Tenofovirに比べて格段に優れた感染抑制効果を持つことを示唆している。性行為HIV

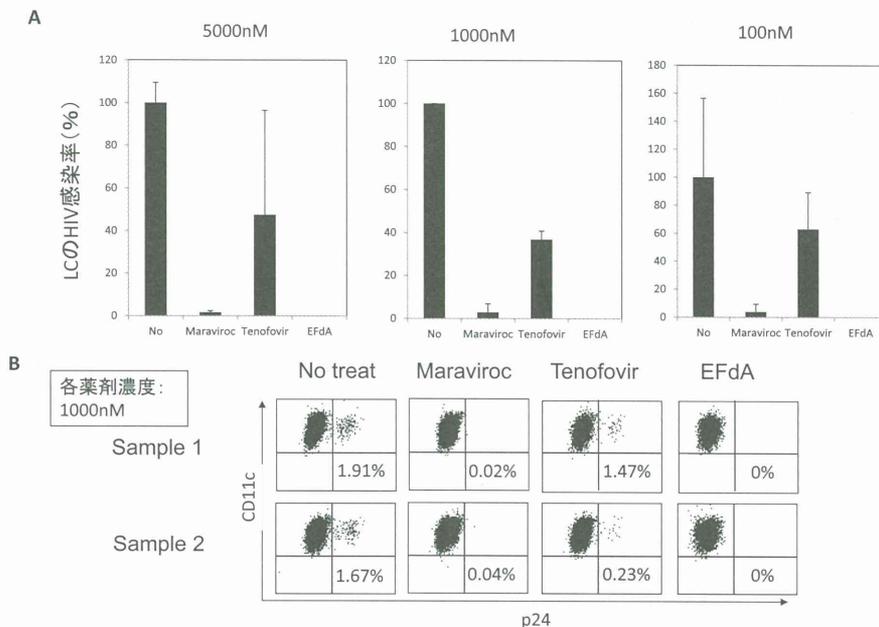


図1

感染において性器粘膜内LCがHIV侵入の重要なターゲットであることより、今回の結果はEFdAをマイクロビサイドとして使用することによって、性行為HIV感染をより確実に予防できる可能性を示唆している。

### E. 結論

EFdAは、マイクロビサイドとして、Tenofovirよりも格段に優れた性行為HIV感染予防効果が期待できると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

原著論文による発表（欧文のみ）

- 1) Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency: Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S. *J Clin Invest.* 2012 Feb 1;122(2):722-32.
- 2) CD70 is selectively expressed on Th1 but not on Th2 cells and is required for Th1-type immune responses: Kawamura T, Ogawa Y, Shimozato O, Ando T, Nakao A, Kobata T, Okumura K, Yagita H, Shimada S. *J Invest Dermatol.* 2011 Jun;131(6):1252-61.

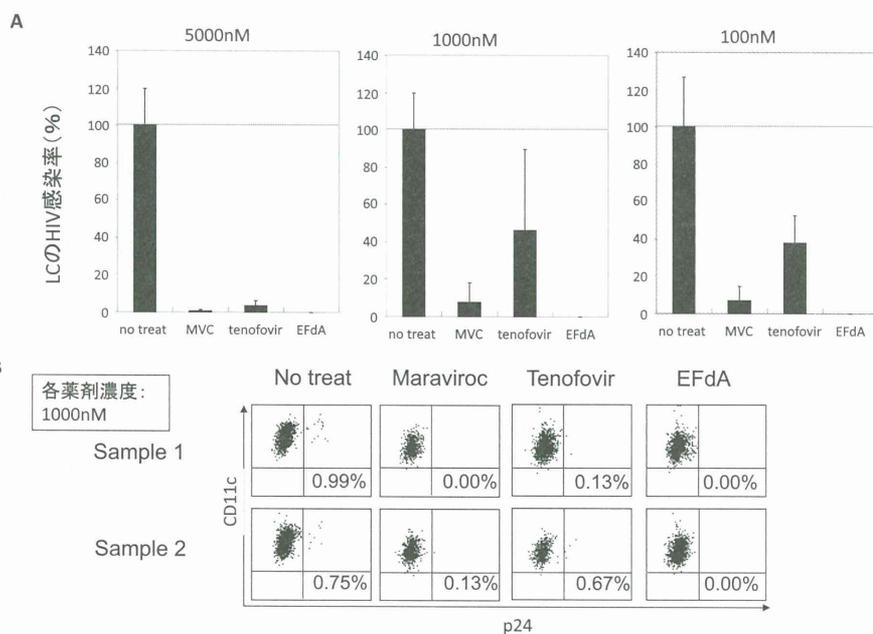


図2

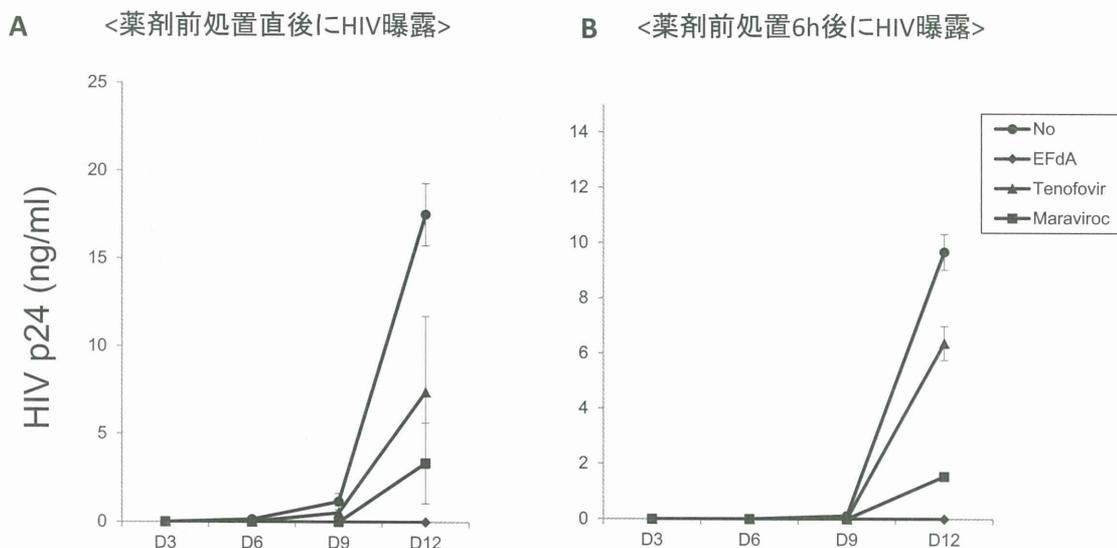


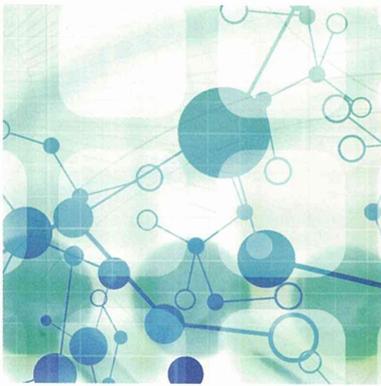
図3

## 2. 学会発表

- 1) T. Matsuzawa, T. Kawamura, R. Aoki, Y. Ogawa, M. Takahashi, Y. Koyanagi, A. Blauvelt, H. Gatanaga and S. Shimada. A novel strategy to prevent sexual transmission of HIV-1 by oral administration of CCR5 inhibitor. The 36th Japanese Society for Investigative Dermatology Annual Meeting. 2011 Dec, Kyoto.

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- |          |    |
|----------|----|
| 1.特許取得   | なし |
| 2.実用新案登録 | なし |
| 3.その他    | なし |



## 耐性HIVを克服する新規薬剤の開発

研究分担者

児玉 栄一 東北大学病院内科・感染症科 助教

### 研究要旨

本研究は増加する耐性HIVの克服に向けた新薬創製を目的としている。本年度はいまだ十分ではないHIV感染を小動物で評価する系の確立を試みた。これまで我々のグループが創製したHIV侵入阻害をこの系で評価した。ラット腹腔内に薬剤を投与し、経時採血サンプルに含まれる薬剤をMAGI法で*in vitro*評価した。この方法は感染性HIVの動物への感染が不要であり、簡便・迅速かつ安全である。CXCR4アンタゴニストと融合阻害剤をこの方法で検討したところすべての動態・活性が検討できた。またラット血清中には非特異的抗HIV効果を有する物質が含まれており、非働化によって一部低下させることも可能であった。今後、耐性克服型阻害剤の開発にこれらの知見をさらに応用させる。

### A. 研究目的

抗レトロウイルス剤の多剤併用によりHIV感染症は大多数の患者においてコントロール可能となりつつある。良好なウイルス抑制が持続できた30代の初感染者では、HIV感染を持たないひととほぼ同程度の寿命を全うできるという推測まで行われるようになってきている。しかしコントロールされた状態であっても体内からHIV自体の排除は達成されていない。そのため、薬の飲み忘れや副作用による治療中断は、その複製を許し、耐性HIV出現の可能性を大きく高めてしまう。耐性が獲得されると治療成績を大きく減弱させ、治療薬の変更が必要となる。

HIVは個々の薬剤に対して耐性を獲得するだけでなく、複数の薬剤に対し同時に耐性化することもあり、多剤耐性株の出現は治療をさらに困難とさせる。そのため、これまでの薬剤、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発にとどまらず、新しい標的に対する薬剤の開発が依然必要とされている。

近年、既存の薬剤とは違うカテゴリーの薬剤、CCR5アンタゴニスト、融合阻害剤、インテグラーゼ阻害剤が開発されてきている。これら新規薬剤の併用により従来の治療薬に抵抗性となった患者においても検出限界以下までウイルス量を低下させることが報告されている。本研究では副作用の少ない創薬標的の同定や創薬基盤を形成することを目的とす

る。具体的に平成23年度は小動物を用いた迅速簡便な*in vivo*薬剤評価系の樹立を試みた。

この研究の期待される成果として次のことがあげられる。現在、新規薬剤の動物実験評価系としてはSIVとHIVのキメラウイルスであるS-HIVを用いたサル実験しかない。この評価には高額な研究費や特殊施設だけでなく、使用する薬剤も大量に必要となる。そのため大学や研究機関だけでなく、企業においてもハードルは高いと考えられる。したがってサル実験に持ち込むべき薬剤スクリーニングに迅速簡便な小動物モデルは依然必須であり、今後の薬剤開発に対して有用である。

### B. 研究方法

- 1) 細胞とウイルス：MT-2とPM1-CCR5細胞はRPMI1640培地を用いて培養した。HeLa-CD4-CCR5/ $\beta$ -galactosidase (MAGI)細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはそれぞれCXCR4またはCCR5をレセプターとするHIV-1<sub>IIIIB</sub>株とHIV-1<sub>Ba-L</sub>株を用いた。これらのウイルスはそれぞれMT-2とPM1-CCR5細胞で継代し、使用するまで-80℃で保存した。
- 2) 坑ウイルス剤：ペプチド製剤は京都大学薬学研究科においてFmoc法によって化学合成した。動物実験にコントロール薬剤としてFuzeon (T-



に投与する薬剤と同一ロットにおいて活性が保たれていることが確認できた。

## 2) ラットでの抗HIV-1<sub>III</sub>B 効果

ラットに薬剤を腹腔内投与した。その後、30分、1、2、4、8、12時間ごとに採血をおこない、血清を得た。この血清に含まれる抗HIV-1<sub>III</sub>B成分を検討した。ネガティブコントロールとしてPBSを投与したラットの血清を用いた。ネガティブコントロールの血清中にも非特異的抗HIV-1<sub>III</sub>B効果が認められ (Fig. 2)、約90倍希釈でその効果がなくなることから、それ以上の希釈倍率で効果を示したものを陽性とした。CXCR4アンタゴニストの2剤は投与後2-4時間で活

性が測定できなくなった。

融合阻害剤ではコントロールに使用したT-20が高い活性を示した。ピークでは1000倍以上希釈しても効果を示し、12時間までその効果を計測可能であった。T-20EK/S138Aは次世代型融合阻害剤としてT-20にEK motifと耐性関連変異を導入して活性と耐性株への効果増強を図ったペプチドである。その効果は200倍希釈に達し、効果持続も約12時間でT-20と同等の血中安定性であった。SC29EKの活性はT-20EK/S138Aよりもやや高めであったが効果の持続という点では2-3時間程度と短めであった。一方、Roche/Trimeris社が開発した次世代型融合阻害剤TRI-1144は効果こそT-20に及ばなかったがラット個

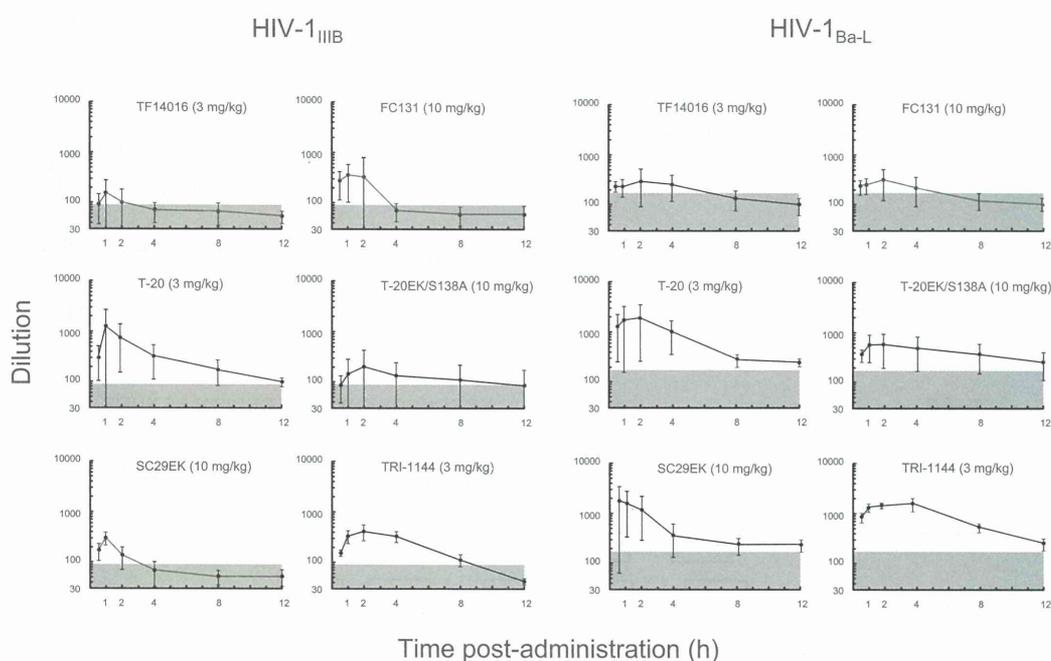


Fig. 2. Anti-HIV-1 activity of drugs *in vivo*

Six groups of 6 rats were administrated with each drugs by intra-peritoneal injection, and then rat sera were harvested at different time points post-administration. All serum samples were detected by the MAGI assay for 50% inhibition of infections of HIV-1<sub>III</sub>B and HIV-1<sub>Ba</sub>L. This experiment was done in triplicate for each rat. Data represent mean  $\pm$  SD of 6 rats. Gray shade indicates average results of age-matched rat sera as negative controls.

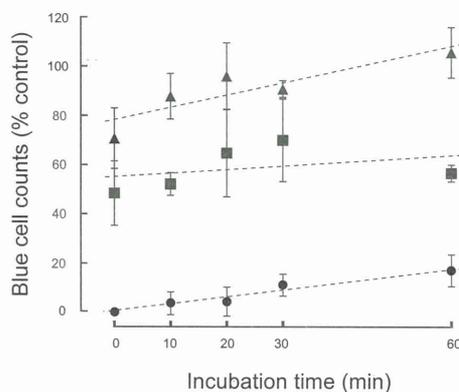


Fig. 3. Heat inactivation of sera

Rat sera without drug administration were examined for the MAGI assay. Heat inactivation was performed at 56 °C. Ten-fold dilution of sera was resistant to heat inactivation even after 1h inactivation (\*20%). In 1000-fold dilution, most of the inhibitory effect was disappeared.

体間で安定した効果を示し、SD値が小さくなった。

### 3) ラットでの抗HIV-1<sub>Ba-L</sub>効果

抗HIV-1<sub>mb</sub>効果と同様にラットでの抗HIV-1<sub>Ba-L</sub>効果を検討した。HIV-1<sub>Ba-L</sub>ではネガティブコントロールでの効果がやや高めで130倍程度まで効果が見られた。CXCR4アンタゴニストはほとんど効果を示さなかったが、約2倍の弱い非特異的活性の増強が見られた。T-20はHIV-1<sub>mb</sub>と同様に効果を示した。他の融合阻害剤はHIV-1<sub>mb</sub>よりも概ね活性が高く出していた。T-20EK/S138AとTRI-1144の効果持続時間はHIV-1<sub>mb</sub>と同等であった。SC29EKはHIV-1<sub>Ba-L</sub>で活性が上昇していたが、活性の持続という点では短めであった（4時間程度）。

### 4) 血清非働化の影響

本研究ではラット血清に含まれる非特異的因子が抗HIV効果を示していた。この物質が何であるかを検討するため、56℃で非働化を試みた。Fig. 3で示したようにHIV- HIV-1<sub>mb</sub>で検討したところ基本的には1時間非働化を続けても10倍希釈では20%程度の活性の低下しか見られなかった。このため非働化を行ったとしても投与薬剤の活性が100倍以上ないと本法では測定できないと考えられる。しかし、1000倍希釈した血清では1時間の非働化でほぼ活性が見られていないため非働化より希釈が有用であることが示唆された。

### 5) HPLC解析

今回検討したサンプルを血清中からHPLCを用いての検出を試みた。FC131の30 mg/kgとT-20の3 mg/kgでのピーク時にのみシグナルが得られた。つまりHPLCと比べても高感度で検出しえることが分かった。

### 6) 毒性

今回投与した薬剤はすべて10 mg/kgまで毒性が見られなかった。これはヒトに投与した場合60 kgと考えて一回投与量600 mgに相当する。

## D. 考察

本研究は耐性HIVを克服するための新薬の創製を目的としていることから、本年度は抗HIV剤の効果判定のために小動物評価系を確立、我々が創製したHIV侵入阻害をラットで検討した。本ラット評価系は、単回投与に対して、繰り返し採血が行うことが

できる。さらなる小動物であるマウスにおいては、採血を十分にまた複数回できないため、正確な動態を調べることができなかった。ラットで動態を検討した後に採血回数を減らしたマウス系で行えばさらに薬剤の投与量を減らすことも可能であろう。今回のようにラット1群6匹を使用し10 mg/kgで投与をした場合、総薬剤量は10 mg以下で十分である。血清分離後、すぐにMAGIアッセイを行った場合、最短3日で結果を得れる。またこの血清はいろいろなHIV株に試すことも可能で、複数の臨床分離株に対応可能である。事実HIV-1<sub>mb</sub>とHIV-1<sub>Ba-L</sub>に対する効果は同一ラット血清を用いて検討可能であった。HIV感染を動物で行う場合、HIV株ごとに1群を用意する必要があり、またばらつきも大きくなると考えられる。

同様にHPLCでも血中の薬剤濃度を検討したが、10 mg/kg以上の濃度にした場合でのみピーク値がかるうじて計測可能な程度であった。つまりMAGI法はHPLC以上の感度が期待できると考えられる。HPLCでは部分的に分解されたものやタンパクに不可逆的に吸着されてしまったものも検出されてしまい、フォールスポジティブにもなりうる。また試験薬剤を放射性同位元素等でラベルすることによって飛躍的な検出感度向上が見込まれるが、放射性同位元素取扱施設における動物実験、サンプルの調製、薬剤へのラベルなど様々な制約が出てくると思われる。

今回使用した薬剤は、すべてペプチド製剤であり、特にT-20が熱安定性に乏しいことなどから非働化は行わなかった。血清を1000倍まで希釈すれば、1時間の非働化で完全なる不活性化が可能であるが、血清希釈率が低い場合、血清中に含まれる非特異的抗HIV物質の完全不活化は難しいことが判明した。

本研究でコントロール薬剤として使用したT-20やその耐性株に効果を示すSC29EK、T-20にEKモチーフと耐性関連変異S138Aを追加して耐性株効果を増強させたペプチドT-20EK/S138A、ロッシュ・トリメリス社が次世代型として開発を行っていたTRI-1144は血中半減期に差はあったもののすべてが効果を示した。またこれらの薬剤は通常皮下投与であるため、腹腔内投与では正確な薬物動態を反映していないかもしれない。今後は投与方法についても検討をしていきたい。実際、我々が開発したEKモチーフを有するペプチドは血清中に含まれるタンパクへの結合が少なく、血清濃度にその効果が影響されないことを見出していたが（Antimicrob Agents Chemother 2009）、腹腔内投与ではT-20よりも効果がやや低下する結果が得られた。皮下投与と腹腔内

投与の差がこれらの結果につながったのかもしれない。これらのペプチドは耐性化に試験管内でも長期間を要し、さらに多くの変異を要することから、実際の感染患者内で容易に耐性株は出てこないと予想される。このことは長期に亘る安定的な投与につながり、耐性検査等のコスト削減にも有用である。さらなる開発は意義のあることと考えられる。

## E. 結論

耐性 HIV を克服するための新薬の創製を目的とし、本年度は新規抗 HIV 阻害剤の迅速かつ簡便な小動物評価系の確立を試みた。ラットを用いることで比較的少量の薬剤でその血中動態を MAGI 法にて検出する。この方法は HPLC 以上の高感度を有している。抗 HIV 剤以外の評価系としても応用可能であると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Matthew M. Schuckmann, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Yasuko Sakagami, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos: K70Q adds high-level tenofovir resistance to “Q151M complex” HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 6:e16242, 2011
- 2) Karen A. Kirby, Kamalendra Singh, Eleftherios Michailidis, Bruno Marchand, Eiichi N. Kodama, Noriyuki Ashida, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos: The sugar ring conformation of 4'-ethynyl-2-fluoro- 2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase. *Cellular and Molecular Biology* 57: 39-44, 2011
- 3) Shenwei Li, Toshio Hattori, Eiichi N Kodama: Epigallocatechin gallate inhibits HIV reverse transcription step. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 21:239-243, 2011
- 4) Kazuki Izumi, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Stefan G. Sarafianos and Eiichi N. Kodama: Potent anti-HIV-1 activity of N-HR-derived peptides including a deep pocket-forming region without antagonistic effect on T-20. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 22:51-55, 2011
- 5) Tanyaradzwa P. Ndongwe, Adeyemi O. Adedeji, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Emily M. Ryan, Devendra K. Rai, Karen A. Kirby, Angela S. Whatley, Donald H. Burke, Marc Johnson, Shilei

- Ding, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, Ei-Ichi Kodama, Krista A. Delviks-Frankenberry, Vinay K. Pathak, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos: Biochemical, inhibition, and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. *Nucleic Acids Research* 40:345-359, 2012
- 6) Fusako Miyamoto and Eiichi N. Kodama: Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Fusion Inhibition Peptides: Designing the Next Generation of Drugs *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 22:151-158, 2012
  - 7) Yosuke Maeda, Kazuhisa Yoshimura, Fusako Miyamoto, Eiichi Kodama, Shigeyoshi Harada, Yuzhe Yuan, Shinji Harada, and Keisuke Yusa: *In vitro* and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. *Journal of AIDS and Clinical Research*, in press 2012

### 2. 学会発表

- 1) Atsuko Hachiya, Matthew M. Schuckmann, D Griffin, Karen A. Kirby, YT Ong Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama, Stefan G. Sarafianos: HIV-1 Reverse Transcriptase Polymorphism 172K Suppresses the Effect of Clinical Resistance Mutations to both NRTI and NNRTI. **18<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Boston, MA Feb 27-Mar 2, 2011
- 2) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Yee Tsuey Ong, Daniel T. Griffin, Matthew M. Schuckmann, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama and Stefan G. Sarafianos: HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Polymorphism 172K Suppresses the Effect of Clinically Relevant Drug Resistance Mutations to Both Nucleoside and Nonnucleoside RT Inhibitors. **12<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance**, Hershey, Pennsylvania, Nov 6-9, 2011
- 3) Eleftherios Michailidis, Stephen H. Hughes, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Devendra Rai, Jordan Wilkins, Kamalendra Singh, Bruno Marchand, Mark Hannink, B. Christie Vu, Victor Marquez, Ei-Ichi Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos: Effect of 4'- and 2-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase. **12<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance**, Hershey, Pennsylvania, Nov 6-9, 2011

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし





## 薬剤耐性症例に対する治療の研究

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エイズ治療開発センター  
医長

研究協力者

**大出 裕高**

(財) エイズ予防財団リサーチレジデント

**鬼頭 優美子**

(独) 国立病院機構名古屋医療センター

### 研究要旨

薬剤耐性症例に対する治療の研究として、protease inhibitor耐性non-subtype B HIV-1の治療薬選択に対するVLP ELISA法の有用性を検討した。VLP ELISA法を用いた薬剤耐性表現型検査の結果から適切な治療薬選択が可能になることが明らかとなった。また、今後、薬剤耐性症例の治療に使用される頻度が高まると予想されるmaravirocの適正利用のため、指向性の表現型検査法の確立を行った。今後、多検体で検査を実施し、遺伝子型検査として用いられているGeno2Pheno法の結果および臨床経過、治療経過を併せて検討することにより、適切な使用方法を提起することが必要である。

### A. 研究目的

新規抗HIV薬の開発と薬剤感受性検査の有効活用により、多剤耐性HIV感染患者に対しても有効なsalvage療法を行うことが可能になった。しかしながら、non-subtype B薬剤耐性HIV-1の治療方法に関する知見は限られている。また、高度薬剤耐性症例に対しては3クラス以上の薬剤を併用することも多く、副作用の少ない治療方法を検討することが重要である。新しいクラスの抗HIV薬maraviroc (MVC)は副作用や薬剤相互作用が少なく、salvage療法におけるkey drugやNRTI sparing regimenにおいて使用頻度が増すと予想される。

本研究では、ウイルス学的治療失敗に至ったsubtype C HIV-1症例に対し、これまでに開発したHIV protease 活性測定系であるVLP ELISA法により薬剤感受性検査を行い、治療薬選択に対する有用性を検討した。また、MVCの適応を的確に判断可能にするため、HIV指向性表現系検査法の確立を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 検討症例の概要

##### a. subtype C HIV-1 感染症例

HIV-1に感染した母親から生まれた小児がCMV感染症の発症を契機に、母子共にHIV感染症と診断された。感染児に対して、ABC+3TC+LPV/rによる抗

HIV療法が開始されたが治療失敗し、前医から名古屋医療センターに紹介転院となった。転院時、感染児のCD4 count  $469 / \text{mm}^3$  (CD4% 20)、viral load  $4.10 \times 10^4$  copies / ml。母親は転院時未治療でCD4 count  $49 / \text{mm}^3$ 、viral load  $5.11 \times 10^5$  copies / mlであった。

##### b. 指向性検査を行った症例

NMC191は50代ブラジル人男性。アムーバ赤痢罹患を契機にHIV感染症と診断された。Subtype B。初診時CD4 count  $75 / \text{mm}^3$ 、viral load  $1.05 \times 10^5$  copies/ml。NMC192は60代日本人男性梅毒罹患を契機にHIV感染症と診断された。Subtype B。初診時CD4 count  $79 / \text{mm}^3$ 、viral load  $4.40 \times 10^5$  copies/ml。

### 2. VLP ELISA法

方法の概略を図1に示す。Subtype C HIV-1感染症例の血漿から分離したHIV genome RNAを鋳型としてprotease領域をRT-PCR法で増幅し、InFusion cloning systemを用いてpVLP IFCにクローニングした。母児それぞれ遺伝子型検査を行いmajor cloneを選択しGenotypic susceptibility score (GSS)をthe Stanford HIV Resistance Databaseを用いて算出した。また、VLP ELISA法によりDRV、LPVに対するIC50を求めた。Fold resistanceとしてHXB2 proteaseのIC50に対する比を用いた。