

抗HIV薬の耐性メカニズムの研究

研究分担者

杉浦 亙

(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・免疫研究部
部長

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・免疫研究部
流動研究員

松岡 和弘

(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・免疫研究部
流動研究員

研究要旨

抗HIV薬剤耐性獲得機序を理解するために (a) RT阻害剤耐性を評価できる新規 *in vitro* アッセイを構築しNNRTI耐性変異を持つ臨床検体11例の評価を行い、新規アッセイの有用性を確認した。(b) HIV-2 CRF01_ABの臨床経過をモニタリングし、治療ガイドラインが確定していないHIV-2感染症の治療方針決定において薬剤耐性検査によるガイドが重要である事を示した。さらに (c) IN遺伝子の多様性の解析とそのIN阻害剤感受性に及ぼす影響を明らかにするために、INの活性中心近傍に多数の変異を持つ3症例を対象にIN耐性変異との相互作用を解析し、IN活性中心近傍の変異がウイルスの増殖能力に影響する事を明らかにした。

A. 研究目的

抗HIV薬剤耐性は近年の優れた薬剤の登場により以前ほどは問題にならなくなっているが、それでも治療に難渋するレベルの薬剤耐性症例が治療を受けている患者の2%程度いるとされる。また、薬剤耐性HIVによる新たな感染が新規にHIV/AIDSと診断される症例の10%を占めており、初回治療を導入する際の薬剤耐性検査の重要性が増している。また、本邦でHIV/AIDS症例が始めて確認されてからおおよそ30年、抗HIV療法が導入されてからおおよそ20年が経ち、宿主免疫によるある種の淘汰そして抗HIV薬による選択等の影響を受けて感受性株あるいは野生株とされるウイルスは変貌しつつある。それに伴い、かつては薬剤耐性変異では無かったものの、反対に薬剤耐性変異とされていたものが再評価されつつある。また、インテグラーゼを標的とした新たな薬剤も登場してきており、このことから、薬剤耐性の理解を更新していくことが求められる。本研究では酵素学的技術を応用した新しい逆転写酵素阻害剤の薬剤耐性検査技術の実用化、インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルの薬剤耐性獲得機序の解明、さらに近年日本でも報告が散見されるHIV-2感染症例の

薬剤耐性について解析を行った。

B. 研究方法

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

開発を進めている逆転写酵素 (RT) のDNAポリメラーゼ活性の新規検出系Cell-free Phenotypic Assay (CFPA) の原理を図1に示す。薬剤耐性RTの場合、RT活性が阻害されないためDIG標識プライマーに結合したacceptor beadsと取り込まれたbiotin標識のdUTPに結合したdonor beadsとの間でエナジートランスファーによって発光シグナルが検出される。一方で、薬剤感受性RTでは、RT阻害剤を添加するとDIG及びビオチン標識されたcDNAを合成できないため、発光シグナルは検出されない。本検出法とHIV感染性分子クローンよりPCR法により転写鑄型を作成し、コムギ無細胞合成したRTを用いて、野生型RT (NL4-3) と11種類の薬剤耐性RT (臨床検体由来) について、lamivudine [3TC]、efavirenz [EFV]、Etrabirine [ETR]、Rilpivirine [RPV] に対する薬剤耐性を比較した。

b. HIV-2 薬剤耐性の解析

本年度は、抗HIV療法を開始した1例のHIV-2 CRF01_AB感染症例について、ウイルス学的治療効果と免疫学的治療効果を詳細にモニタリングした。ウイルス学的治療効果は、血漿HIV-2 RNA量を定量RT-PCR法にて測定することにより評価した。免疫学的治療効果は、CD4陽性T細胞数を測定することにより評価した。加えて、抗HIV療法中に血漿HIV-2 RNA量が再上昇した場合には、薬剤耐性ウイルスの出現を疑い、遺伝子型薬剤耐性検査を実施すると共に、検出されたアミノ酸変異が薬剤感受性に与える影響を組換えウイルスを作成して調べた。

c. 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の有する遺伝的多様性がその後のRAL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）獲得している多剤耐性症例から増幅したIN配列にRAL耐性変異Y143CとG140S+Q148Hを導入したりコンビナン

ト・ウイルスを作成しそれぞれの増殖性、RAL感受性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われている薬剤耐性検査および解析は名古屋医療センター研究倫理委員会において承認を受けている。

C. 研究結果

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

感受性検査の結果が明らかな感染性クローンを用いた実験では、図2に示すようにCFPAでの評価は3TC、EFV、ETR、RPVにおいて高い相関を示した(3TC: $R^2=0.93$, EFV: $R^2=0.91$, RPV: $R^2=0.90$, ETR: $R^2=0.95$)。さらに11種類の臨床検体由来薬剤耐性RTについて、EFV、ETR、RPVに対する薬剤耐性度を評価した結果、既知の薬剤耐性レベルと概ね一致した。しかしながら、RPVではK103N保有検体において若干の相違が観察された。(図3)

ステップ1: 逆転写酵素の合成

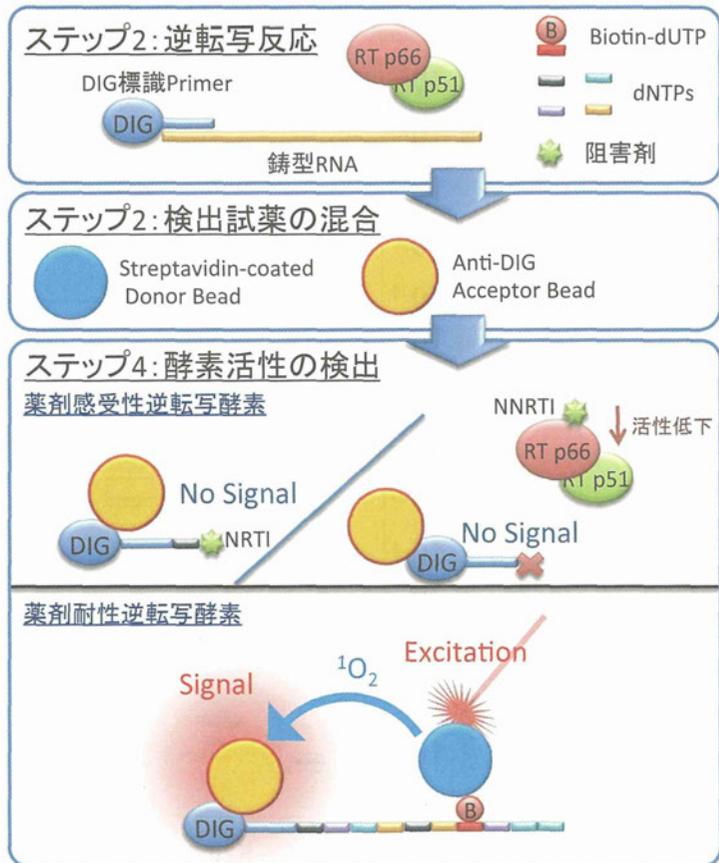
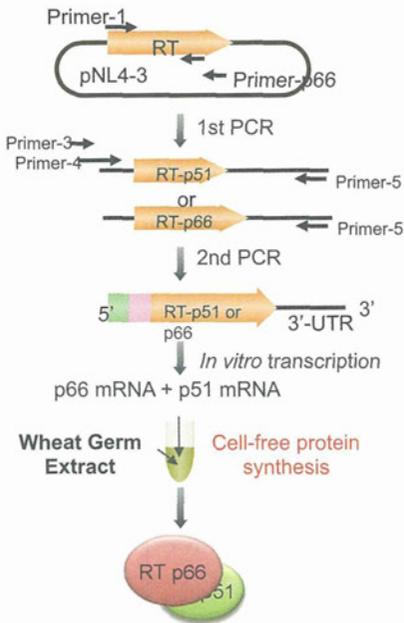


図1 CFPAによる逆転写酵素活性測定法の流れ

b. HIV-2 薬剤耐性の解析

初回治療であるアバカビル/ラミブジン+ロピナ

ビル/リトナビルは著効し、治療開始後1.6ヶ月間に、血漿HIV-2 RNA量は 2.6×10^4 copies/mlから検出限度 (40 copies/ml) 以下まで速やかに減少し、その

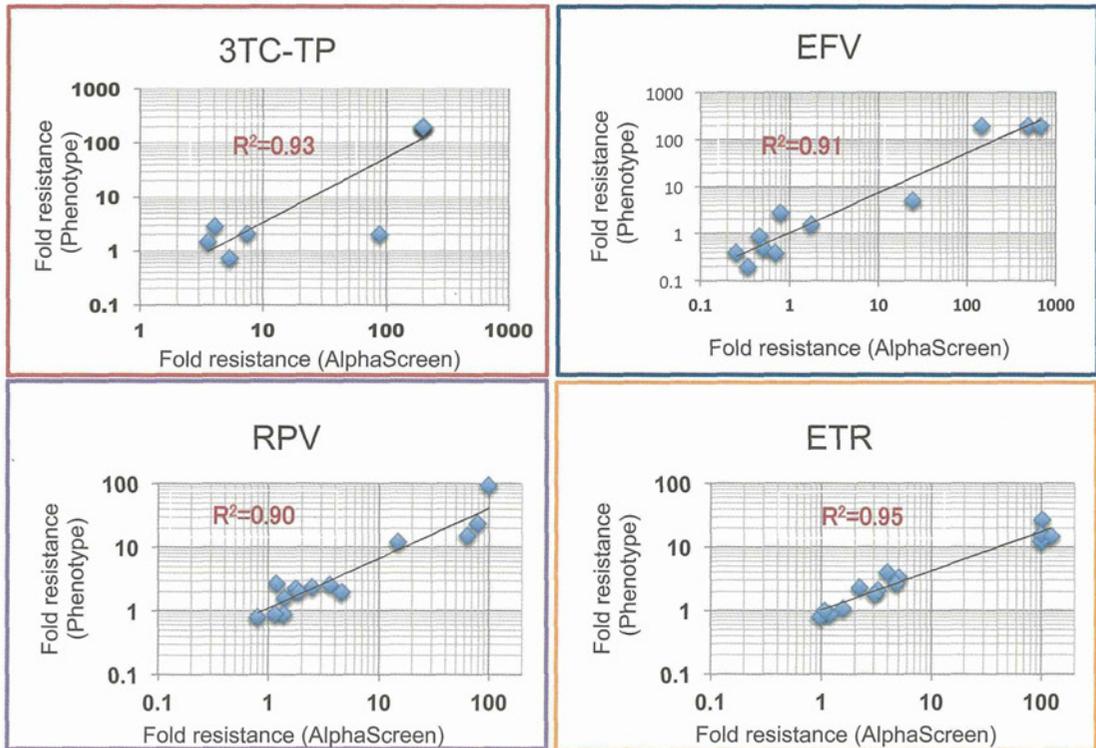


図2 CFPA法とウイルスを用いた感受性検査法は有意な相関を示す

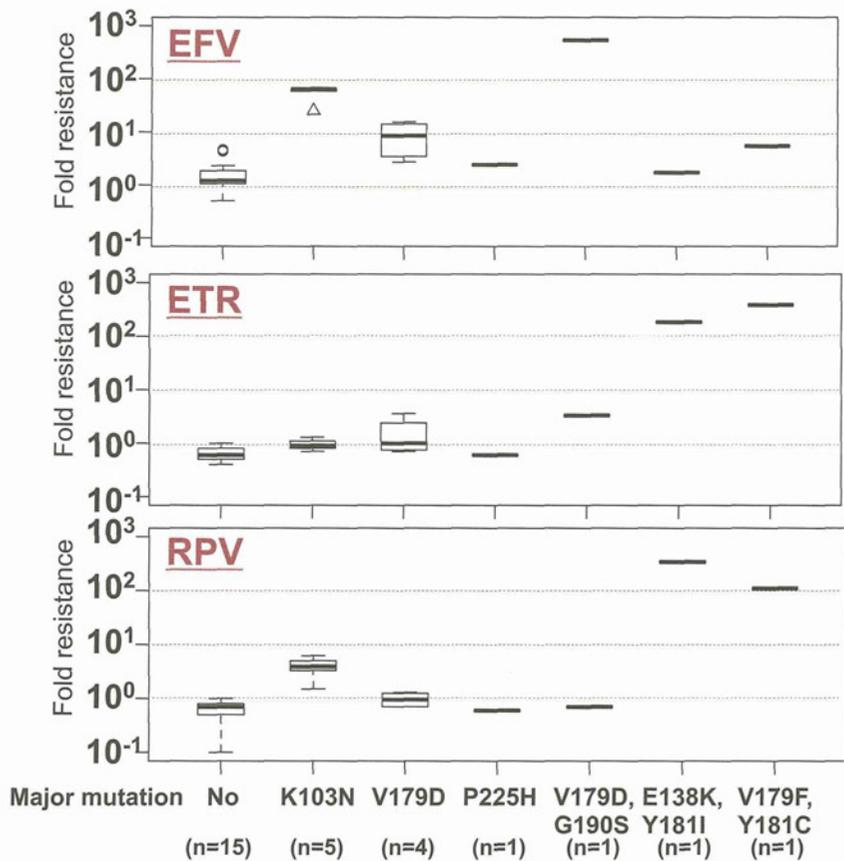


図3 CFPA法によるNNRTI感受性の評価は既存の結果と良く一致する

後も15.6ヶ月目まで検出限度以下を維持した(図4 point a)。しかし、18.7および21.9ヶ月目に低レベルながら連続した血漿HIV-2 RNA量の再上昇(250および310 copies/ml)を認め(point b)、遺伝子型薬剤耐性検査により、プロテアーゼ内にR70K変異、逆転写酵素内にM184V、D192N、R200K、D345N変異の誘導が確認された。薬剤感受性試験により、ラミブジン高度耐性化(>5031.4倍)と共にエムトリシタビンへの高度交差耐性化(>6153.8倍)、アバカビルへの中度耐性化(6.2倍)を認める一方、ロピナビルの有効性(2.1倍)の保持が確認された。この薬剤耐性ウイルスに対してテノフォビルの有効性(0.7倍)が確認できたことから、薬剤変更を試みたが副作用により維持できず、インテグラーゼ阻害薬ラルテグラビル(4.3倍)の追加により、23.1ヶ月目から最新の44.2ヶ月目まで二年弱にわたり、再度、血漿HIV-2 RNA量を検出限度以下に抑制することに成功している(point c)。これに加えて、治療開始

前に100 cells/ μ L程度にまで減少していたCD4陽性T細胞数は、最新の44.2ヶ月目には400 cells/ μ L程度にまで回復している。

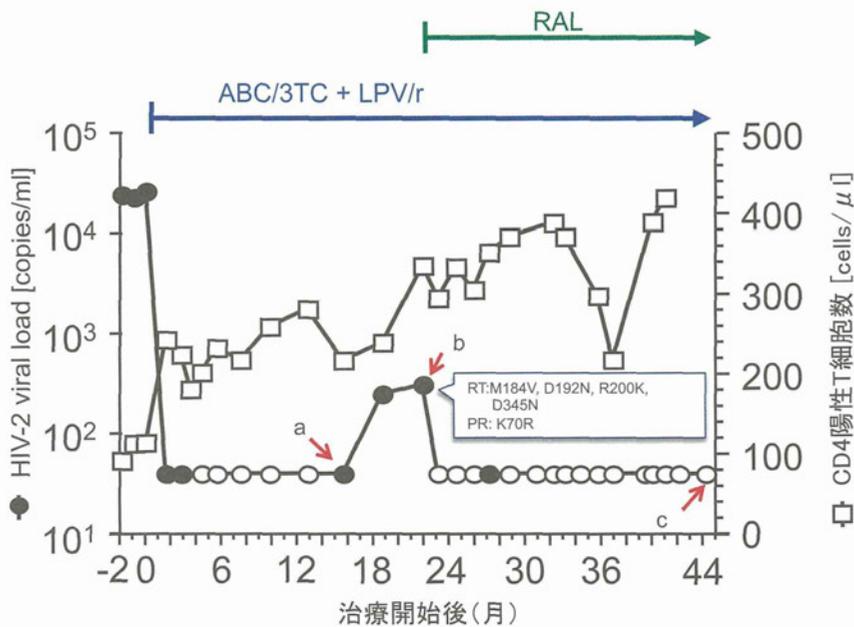
c. IN阻害剤の耐性機構の解析

昨年までの結果では多様性がRAL耐性に及ぼす影響を観察できなかったことから、本年度は確認のために新たにもう1例多剤耐性症例SHIN-3を選び(表1)、RAL耐性変異をもつクローンを作成し評価した。その結果解析症例は3例となった。表2に結果を示すがG140S+Q148Hの変異ではサンプル間で耐性度の大きな違いが認められた。

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



白丸は核酸増幅シグナルが全く検出されなかったことを示している

ABC: アバカビル 3TC: ラミブジン LPV/r: ロピナビル/リトナビル RAL: ラルテグラビル

図4 抗HIV療法を施行したHIV-2 CRF01_AB感染例の経過

表1 多剤耐性3症例におけるRAL領域の遺伝子変異

I D [変異数]	N-terminal (1-49)	Catalytic core (50-212)	C-terminal (213-288)
SHIN 1 [22]	10E, 11D, 25E, 31I	101I, 119G, 122I, 123S, 124T, 125A, 127K, 157Q*, 160Q, 176L 187K, <u>201I</u>	215N, 221S, 222K, 232D, 256E, 269K
SHIN 2 [11]	10E, 24G	101I, 123S, 124T, 127K, 157Q*, 160Q, <u>201I</u> , 205S	232D
SHIN 3 [17]	6E, 10E, 14R, 22I, 28M, 31I, 32I, 35Q	<u>72I</u> , 101I, 123S, 124T, 127K, <u>156N</u> , <u>200L</u> , <u>201I</u>	232D

*: RALによる薬剤耐性に関連した変異
_: その他のINインヒビターによる変異

表2 RAL耐性変異挿入によるRAL感受性の変化

	RAL 耐性変異						
	WT	148K	148R	148H	155H	143C	140S +148H
HXB2	0.7	4.0 (5.7)	5.5 (7.9)	26.8 (38.3)	12.7 (18.1)	19 (27.1)	204.7 (292.4)
SHIN1	1.2	7.4 (6.2)	46 (38.3)	21.7 (18.1)	27.5 (22.9)	5.8 (4.8)	38.5 (32.1)
SHIN2	1.8	8.8 (4.9)	33.5 (18.6)	15.3 (8.5)	48 (26.7)	6.4 (3.6)	554.9 (308.3)
SHIN3	2.5	15.4 (6.2)	15.2 (6.1)	18.4 (7.4)	23.5 (9.4)	3.1 (1.2)	62.2 (24.9)

IC₅₀ nM (fold^a)

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思われる。CFPAと遺伝子型検査法の結果の乖離が確認できたサンプルについては、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ことを計画している。

b. HIV-2薬剤耐性の解析

最初となる HIV-2 CRF01_AB 感染例の抗HIV療法施行例を示した。薬剤感受性検査結果に基づいて薬剤を選択することにより、良好なウイルス学および免疫学的治療効果が得られた。現在、薬剤耐性プロファイルの情報不足している HIV-2 感染症においては、薬剤感受性試験の実施が効果的な治療を継続するために必須であると思われる。治療薬選択の

時間を短縮するためにも、HIV-2のより詳細な薬剤耐性プロファイリングが今後の重要な課題であると考察される。

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。Q140S+G140H は耐性度がいずれの症例においても高いが、比較してみるとサンプル間で数倍の開きが認められ、これが獲得されている自然変異の影響なのか、あるいは単に検査のばらつきなのか今後の検証が必要と思われる。これまではランダムに検体を選び RAL 耐性変異を組み込んできたが、耐性獲得の pathway の理解には既に RAL 治療に失敗して薬剤耐性を獲得した症例について、遡る形で研究を進めていくことが望ましいと考えられた。

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. 論文発表

- 1) Jahanbakhsh F, Ibe S, Hattori J, Monavari SHR, Matsuda M, Maejima M, Iwatani Y, Memarnejadian A, Keyvani H, Azadmanesh K, Sugiura W. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Iran: genomic evidence of CRF35_AD predominance and CRF01_AE infection among individuals associated with injection drug use. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29: 198-203.2013
- 2) Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsin T, Matsuoka K, Iwatani Y, Puthanakit T, Ananworanich J, Sophonphan J, Mahanontharit A, Naoe T, Vonthanak S, Phanuphak P, Sugiura W. On Behalf Of The Predict Study Team. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther*. 24;9(1):34. 2012.
- 3) Tsuzuki T, Iwase H, Shimada M, Hirashima N, Hibino Y, Ryuge N, Saito M, Tamaki D, Kamiya A, Yokoi M, Yokomaku Y, Fujisaki S, Sugiura W, Goto H. Clinical evaluation of peginterferon alpha plus ribavirin for patients co-infected with HIV and HCV at Nagoya Medical Center. *Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi = The Japanese journal of gastroenterology*. 109(7):1186-1196. 2012.
- 4) Ode H, Nakashima M, Kitamura S, Sugiura W, Sato H. Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in microbiology*. 3:258. 2012.
- 5) Miyamoto T, Nakayama EE, Yokoyama M, Ibe S, Takehara S, Kono K, Yokomaku Y, Pizzato M, Luban J, Sugiura W, Sato H, Shioda T. The Carboxyl-Terminus of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Circulating Recombinant form 01_AB Capsid Protein Affects Sensitivity to Human TRIM5 α . *PloS one*. 7(10):e47757. 2012.
- 6) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis.

Journal of proteomics. 75(15):4863-4873. 2012.

- 7) Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, Yokomaku Y, Yamane T, Watanabe N, Suzuki A, Sugiura W, Iwatani Y. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature structural & molecular biology*. 19(10):1005-1010. 2012.
- 8) Hirano A, Ikemura K, Takahashi M, Shibata M, Amioka K, Nomura T, Yokomaku Y, Sugiura W. Short communication: lack of correlation between UGT1A1*6, *28 genotypes, and plasma raltegravir concentrations in Japanese HIV type 1-infected patients. *AIDS research and human retroviruses*. 28(8):776-779. 2012.
- 9) 都築智之、岩瀬弘明、島田昌明、平嶋昇、日比野祐介、龍華庸光、齋藤雅之、玉置大、神谷麻子、横井美咲、横幕能行、藤崎誠一郎、杉浦互、後藤秀実。当院における hiv、Hcv 重複感染症例に対するペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療成績。 *日本消化器病学会雑誌*. 109(7): 1186-1196. 2012.

2. 学会発表

- 1) J. Hattori, U. Shigemi, M. Hosaka, R. Okazaki, Y. Iwatani, Y. Yokomaku, W. Sugiura. Socio-demographic analysis of treatment-naïve HIV-1-POSITIVE POPULATIONS WITH RECENT OR LONG-TERM INFECTION ESTIMATED BY BED assay in Japan. XIX International AIDS Conference, Seattle, Washington, USA, Jul 22-27, 2012.
- 2) K Suzuki, H Ode, M Fujino, T Masaoka J, Hattori, Y Yokomaku, Y Iwatani, A Suzuki, N Watanabe, W Sugiura. Molecular and Structural analysis of darunavirresistant HIV-1 protease. International Workshop on HIV&Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies, Sitges, Spain, Jun 5-9, 2012.
- 3) S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura, Y. Iwatani. Conformational Conservation of the HIV-1 Vif-Binding Interface on APOBEC3C, DE, and F. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.
- 4) S. Kitamura, H. Ode, M. Nakashima, M. Imahashi, Y. Naganawa, Y. Yokomaku, A. Suzuki, N. Watanabe, W. Sugiura aYI. The APOBEC3C Crystal Structure and the Interface for HIV-1 Vif Interaction. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings - Retroviruses, New York, USA, May 21-26, 2012.
- 5) 松岡和弘、田邊史子、重見麗、服部純子、正岡崇志、森下了、澤崎達也、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦互。コムギ無細胞蛋白質合成系を利用した HIV-1 逆転写酵素の *in vitro* 薬剤感受性解析法の開発。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。

- 6) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦 互。耐性誘導により得た高度ダルナビル耐性HIV-1プロテアーゼの構造学的解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 7) 今橋真弓、泉泰輔、今村淳治、松岡和弘、金子典代、市川誠一、高折晃史、内海 眞、横幕能行、直江知樹、杉浦 互、岩谷靖雅。HIV-1感染伝播・病勢に対するAPOBEC3B遺伝子型の影響に関する解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 8) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、岩谷靖雅、杉浦 互。Plasma RNAとProviral DNAによるHIV指向性遺伝子型の比較解析。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 9) 鬼頭優美子、松田昌和、服部純子、伊部史朗、大出裕高、松岡和弘、今村淳治、岩谷靖雅、杉浦 互、横幕能行。臨床検体由来env全長組み換えHIV-1による指向性検査法の確立。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 10) 服部純子、湯永博之、渡邊 大、長島真美、貞升健志、近藤真規子、南留美、吉田繁、森 治代、内田和江、椎野禎一郎、加藤真吾、千葉仁志、佐藤典宏、伊藤俊広、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡 慎一、伊部史朗、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、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26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 11) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡崇志、岩谷靖雅、杉浦 互。薬剤感受性プロファイリングに裏づけされた新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の良好な治療経過。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2012年11月24-26日。
- 12) 羽柴知恵子、福山由美、伊藤明日美、長谷川真奈美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦 互、横幕能行。HIV陽性者への外来トリアージの必要性に向けて。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 13) 永見芳子、塚本弥生、杉本香織、杉浦 互、福山由美、横幕能行。長期に療養が必要となったHIV感染症患者への支援体制の現状と課題。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 14) 丸山笑里佳、羽柴知恵子、福山由美、杉浦 互、横幕能行。違法薬物使用歴を持つHIV陽性者に対する内科外来での心理的支援の検討。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 15) 榊原美穂、福山由美、羽柴知恵子、長谷川真奈美、伊藤明日美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦 互、横幕能行。外来看護師によるHIV陽性者受診継続のための看護介入判断基準の標準化に向けて。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 16) 渡邊英恵、福山由美、羽柴知恵子、伊藤明日美、長谷川真奈美、渡邊智子、藤谷和美、小川恵子、杉浦 互、横幕能行。HIV陽性女性が安心して将来の妊娠について考えられる外来看護支援に向けて。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 17) 福山由美、大林由美子、杉浦 互、横幕能行。医療機関からみる愛知県内HIV陽性判明の動向～いきなりエイズ減少に向けて～。第66回国立病院総合医学会、神戸、2012年11月16-17日。
- 18) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根 隆、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅。APOBEC3Cの構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイスの同定。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日。
- 19) 大出裕高、鈴木康二、藤野真之、前島雅美、木村雄貴、正岡崇志、服部純子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、岩谷靖雅、杉浦 互。高度ダルナビル耐性HIV-1の分子機序の解明。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日。
- 20) 中島雅晶、北村紳悟、大出裕高、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、横幕能行、山根 隆、渡邊信久、鈴木淳巨、杉浦 互、岩谷靖雅。APOBEC3間におけるHIV-1 Vif結合インターフェイスの違い。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日。
- 21) 岩谷靖雅、前島雅美、北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、黒沢哲平、伊部史朗、横幕能行、杉浦 互。APOBEC3Gの酵素活性非依存的な抗HIV-1作用メカニズム。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月13-15日。
- 22) 北村紳悟、大出裕高、中島雅晶、今橋真弓、長縄由里子、横幕能行、鈴木淳巨、渡邊信久、杉浦 互、岩谷靖雅。APOBEC3Cの結晶構造解析とHIV-1 Vif結合インターフェイスの同定。第12回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月20-22日。
- 23) 伊部史朗、横幕能行、前島雅美、松岡和弘、正岡 宗、岩谷靖雅、杉浦 互。新規HIV-2組換え流行株CRF01_AB感染例の治療経過と薬剤感受性プロファイリング。第14回白馬シンポジウム in 京都、京都、2012年6月7-8日。
- 24) 松田昌和、服部純子、今村淳治、横幕能行、杉浦 互。遺伝子配列解析によるHIV-1指向性の判定とその動向。第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日。

- 25) 今村淳治、横幕能行、服部純子、伊部史朗、天羽清子、塩見正司、杉浦 互. enofovir + Darunavir/r + Etravirineによるサルベージ療法が著効した多剤耐性HIV感染児の一例. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.
- 26) 今村淳治、横幕能行、片野晴隆、安岡 彰、杉浦 互. 名古屋医療センターにおけるカポジ肉腫発症エイズ患者数の動向. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日.
- 27) 伊部史朗、近藤真規子、今村淳治、横幕能行、杉浦 互. HIV-1/HIV-2重複感染疑い例における血清学および遺伝子学的精査解析. 第86回日本感染症学会総会、長崎、2012年4月25-26日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
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 国立感染症研究所エイズ研究センター 室長

研究要旨

今年度は、前年度までに、*in vitro*で誘導したY1 (subtype B) ウイルスの低CCR5発現細胞への馴化ウイルスとmaraviroc (MVC) 高度耐性ウイルスのEnv組換えウイルスを作製し、詳細にgp120の変異とMVC耐性の関連性を調べた。また、種々の抗Env中和単クローン抗体に対する感受性の変化も調べた。その結果、コントロールウイルスは、CD4bs抗体に対してのみ中等度感受性だが、V3やCD4i抗体に対しては高度耐性であった。一方、低CCR5馴化Envを持つウイルスは、V3抗体を除く残りの中和抗体に感受性が高くなった。ところが、高度MVC耐性変異Envウイルスは、V3中和抗体に対してさえも、高度感受性へと変化した。このことは、HIVがMVCから逃避する変異を獲得することにより、それまで耐性であった自己の抗体に対しても感受性へと変化する可能性を示唆している。

A. 研究目的

新規の作用点を持つ薬剤 (coreceptor結合阻害剤、CCR5阻害剤のMVCなど) の耐性変異に関する研究は、これまでの薬剤耐性とは全く様相を異にする。なぜなら、これらはHIVではなく宿主の受容体に作用する抗HIV薬だからである。そこで、昨年度までに*in vitro*誘導を行ったMVC耐性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、種々の抗Env中和単クローン抗体や、ウイルスを分離した症例から得た血清IgG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 μ M)。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のシーケンスを行い、耐性能付与責任変異部位を特定した。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を組み込んだクローンウイルスとMVC感受性の違いを比較した。また、抗Env中和抗体の中和感受性を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附属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。また、遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を取得済みである。

C. 研究結果

昨年度より引き続き使用しているR5臨床分離株Y1は、2009年にhemophiliaの症例から分離された臨床株で、典型的なサブタイプB株である。簡単に*in vitro*耐性誘導の方法を述べると、まずMVCの濃度を1 nMから開始し、徐々に薬剤濃度を上げて行き、最終的には10 μ Mまで上げる(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(IC₅₀: 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ケ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も、はじめに可変領域の選択が起こることが分かった。これは、もともと存在していた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の耐性誘導の時にも同様に観察された。PM1細胞におけるパッセージウイルスとIC₅₀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

度のプラトローの位置が低下していった。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。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。

このようにして樹立された、低CCR5発現細胞への馴化ウイルスとMVC高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスのEnvをpNL43ベースのplasmidに組み込み、それぞれの感染性クローンウイルスを作製した(図1)。これらの組換えウイルスを用いて、より詳細にgp120の変異とMVC耐性の関連性を調べた。その結果、コントロールウイルスに対しては、CD4bs抗体以外の、抗CD4iおよびV3中和単クローン抗体は、感受性がほとんどないか、全く認められなかった。一方、低CCR5馴化Envを持つウイルスは、V3抗体を除く残りの中和抗体に感受性が高くなった。ところが、高度MVC耐性変異Envを持つウイルスは、低CCR5馴化Envを持つウイルスよりもCD4bsとCD4i抗体に対してより感受性になっただけでなく、抗V3中和抗体に対しても高度

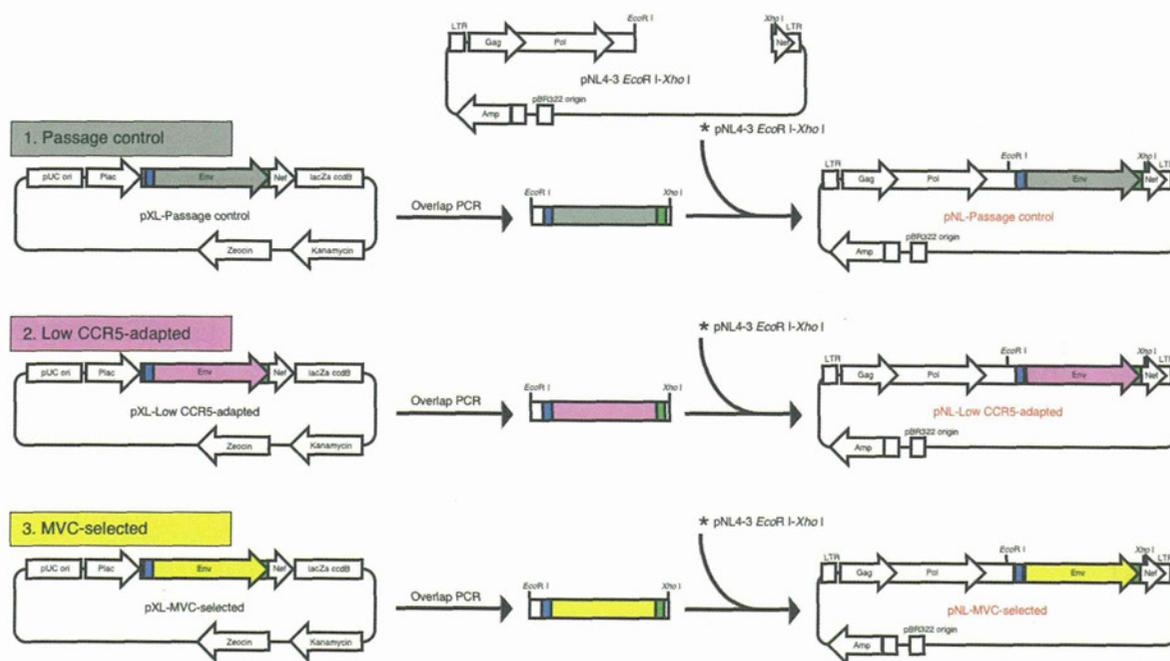


図1 低CCR5馴化ウイルスとMVC高度耐性ウイルスのEnvをもつ感染性クローンウイルスの作製

感受性へと変化した(図2)。高度MVC耐性変異は、抗Env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。つまり、パッセージコントロール、低CCR5発現細胞馴化、MVC耐性変異ウイルスのEnvの順に中和可能な抗体の範囲が広がることが分かった。

D. 考察

今回、低CCR5発現細胞への馴化ウイルス、MVC高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスの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、種々の抗体に対するアッセイを行った。その結果、MVCに高度耐性を付与するEnvの変異がEnv全体の3量体で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、治療効果が長続きする可能性

を示唆している。

来年度は、このMVC治療中の症例から経時的に分離されてくるウイルスが、どのようなフェノタイプとなっていくかを薬剤や抗体への感受性の変化で調べる予定である。また、治療下でウイルスのEnvシーケンスがどのように変遷していくかも併せて調べ、系統樹解析により *in vitro* の変異との比較を行う予定である。

E. 結論

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。このことは、血中抗体価が高い症例にMVCを使用することで耐性変異株の出現を抑制でき、治療効果が長続きする可能性を示唆している。

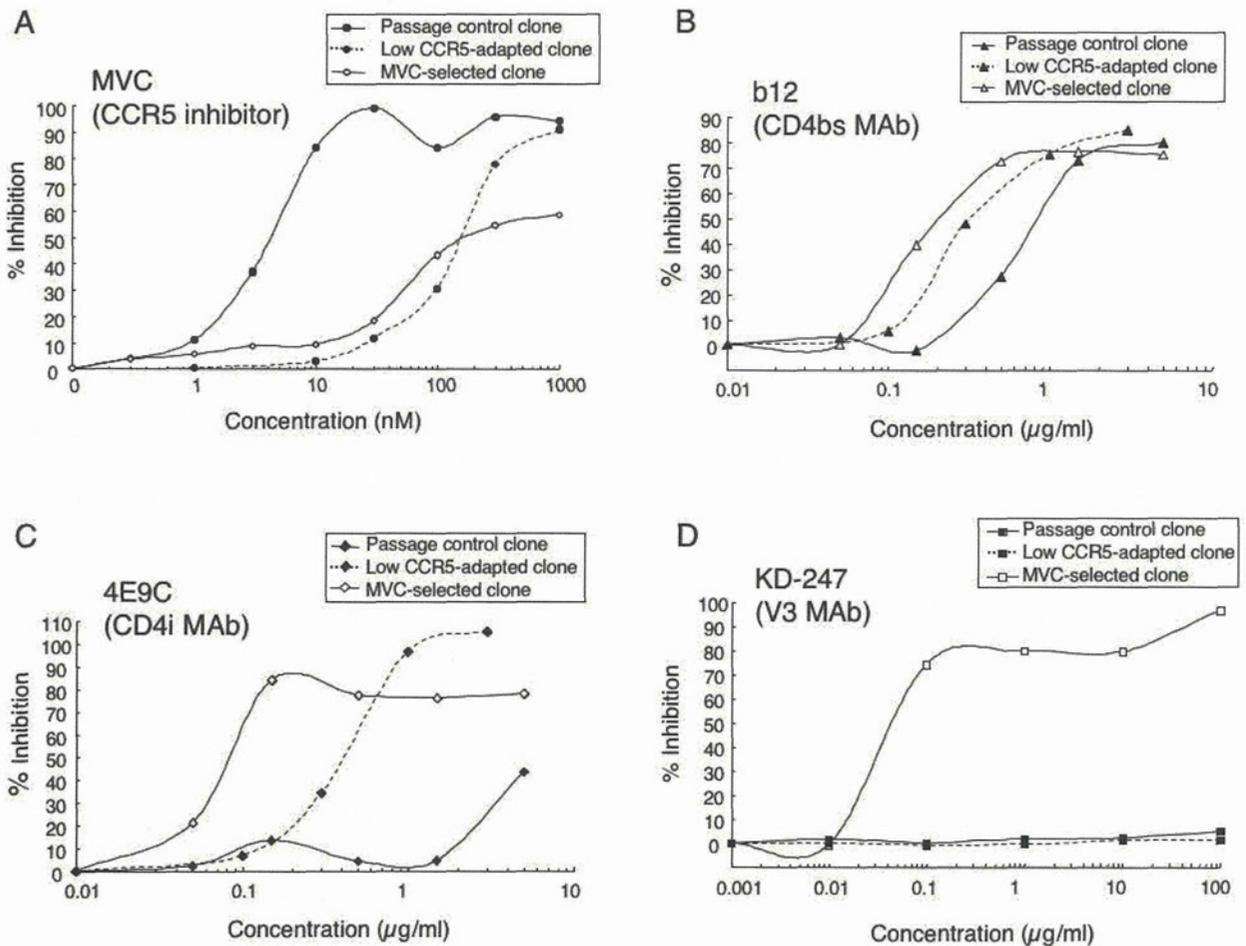


図2 変異Envを持つ感染性クローンウイルスのMVC及び各種NMAbに対する感受性の比較

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (*corresponding author)

- 1) Harada S, Yoshimura K*, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, and Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences *in vitro*. J Gen Virol, in press.
- 2) Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biologically active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 V3 loop. Cell Mol Biol, 2012, 58:71-9.
- 3) Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. PLoS ONE, 2012, 7: e37530.

学会発表

国際学会

- 1) Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced *in vitro* passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- 2) Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
- 3) Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. *In vitro* induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.
- 4) Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. *In vitro* induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.

国内学会

- 1) 原田恵嘉、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、吉村和久。R5臨床分離株を用いたCD4類似低分子化合物誘導体に対する*in vitro*耐性ウイルス誘導。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日[O35-165]
- 2) 桑田岳夫、吉村和久、松下修三。SIV感染サルから分離された中和抗体B404はV3、V4ループを含むEnv立体構造を認識する。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日[O13-062]
- 3) 廣田雄樹、鳴海哲夫、橋本智恵、吉村和久、原田恵嘉、大附寛幸、三浦智行、五十嵐樹彦、相川春夫、野村 渉、松下修三、玉村啓和。HIV外被タンパク質gp120を標的とするインドール型低分子CD4ミミックの創製研究。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日[WS2-007]
- 4) 原田恵嘉、新井啓之、鳴海哲夫、玉村啓和、松下修三、吉村和久。R5臨床分離株を用いた10種のCD4類似低分子化合物に対する*in vitro*耐性ウイルス誘導。第14回白馬シンポジウム、2012.6.7-8, 京都。
- 5) 吉村和久。CCR5阻害剤による耐性変異と中和抗体感受性。第14回白馬シンポジウム、2012.6.7-8, 京都。

H. 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

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、その約90%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外用剤（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。HIVは主に粘膜内ランゲルハンス細胞の感染を介して生体内に侵入するが、今回の我々の研究結果から、新規抗HIV薬：EFdAがランゲルハンス細胞のHIV感染を既存の抗HIV薬より強力にかつ長時間にわたって抑制することが明らかとなり、同剤のマイクロビサイドとしての有用性が示唆された。

A. 研究目的

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。最近、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（4'-Ethylnyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine）は、末梢血単核球を用いた*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）。昨年度の*ex vivo*経皮膚HIV感染モデルを用いた我々の研究結果から、表皮内ランゲルハンス細胞のHIV感染に対して、EFdAがTenofovirよりも優れた感染予防効果を持つことが示された。本年度の研究目的は、EFdAとTenofovirの阻害効果の持続時間を比較検討し、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）。本研究では、単球由来ランゲルハンス細胞（mLC; monocyte-derived LC）を用いて、抗HIV薬：EFdA、Tenofovirおよび新規CCR5阻害剤：マラビロック（MVC）の*in vitro*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末梢血を採取、単球をGM-CSF/IL-4/TGF- β 存在下で一週間培養することでmLCを作製した。次にmLCをEFdA、TenofovirおよびMVC（100-5000 nM）と30分間培養後、各々のmLCにHIV（HIV BaL; R5 HIV）を曝露し、2時間後にmLCを3回PBSにて洗浄し、培養した。HIV曝露7日後にmLCを回収し、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mLCのHIV感染率を比較解析した。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、それぞれのDrug/HIV曝露後mLCと共培養し (mLC: CD4⁺T cells = 1 : 100)、培養上製中の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mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能を比較検討した。

さらに上記の実験において、各種抗HIV薬を30分間曝露後、24, 48, 72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)

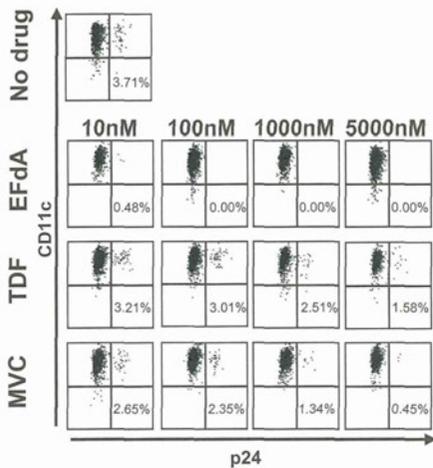
健康ボランティアから採取した血液を用いる研究は山梨大学倫理委員会の了承を得ている (承認番号598)。本研究において用いられるmLCは、ボランティア本人のインフォームドコンセントを得てから使用している。また、ヒト皮膚を用いた *ex vivo* HIV

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)。

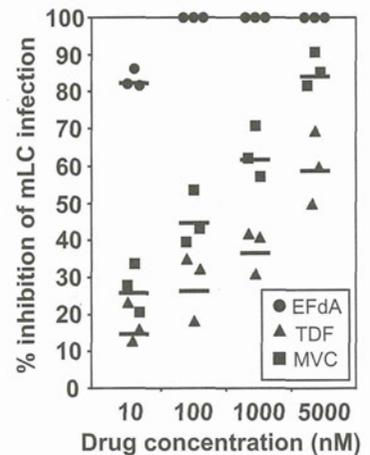
C. 研究結果

図1Aに示す如く、EFdA、TenofovirおよびMVCの各薬剤の前処置は、10-5000 nMのそれぞれの濃度において、mLCのHIV感染を有意に抑制した。驚くべきことに、EFdAによるmLCのHIV感染抑制効果はいずれの濃度においても最も強く、100-5000nMではほぼ100%の抑制効果が得られた。さらに、図1Bに示す如く、3人のボランティアから樹立したmLCいずれの感染抑制実験においても同様の結果が得られた。この各薬剤前処置によるmLCのHIV感染効果はHIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能との相関が認められ、図1C, Dに示す如く、EFdAによるHIV感染播種抑制効果はいずれの濃度においても最も強く、100-5000nMではほぼ100%の抑制効果が得られた。

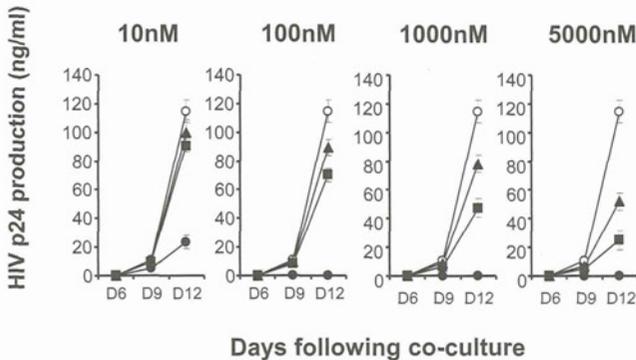
A



B



C



D

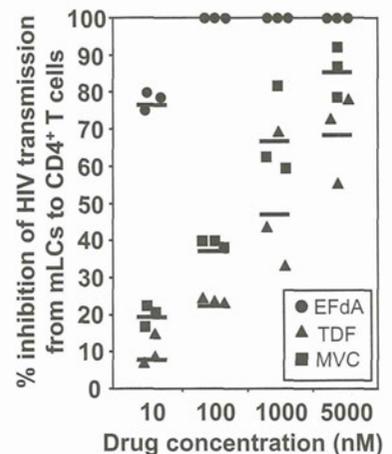


図1 EFdA、TenofovirおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制

また、図2A, Bに示す如く、各種抗HIV薬(1000 nM)を曝露後、すべての薬剤を除去した後に1, 2, 3日の間隔をあけて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、100-5000nMではほぼ100%の抑制効果が得られた。興味深いことに、TenofovirおよびMVCは曝露後3日でもその感染抑制効果をほとんど失うのに対し、EFdAは曝露後3日でもその感染抑制効果を保持することがわかった。さらに、HIV感染mLCからCD4陽性T細胞へのHIV播種能試験においても同様の結果が得られた(図2C, D)。

D. 考察

抗HIV薬 Tenofovirゲルの臨床試験では、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、mLCのHIV感染抑制実験において、新規抗

HIV薬 EFdAがTenofovirに比べて格段に優れた抑制効果を持つことを示唆している。性行為HIV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。また、EFdAが3日間その感染抑制効果を保持することから、マイクロビサイドとして使用した場合、一回の外用で数日間その感染予防効果が持続することが期待される。

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ともに、その感染予防効果が長期間持続することが示唆された。

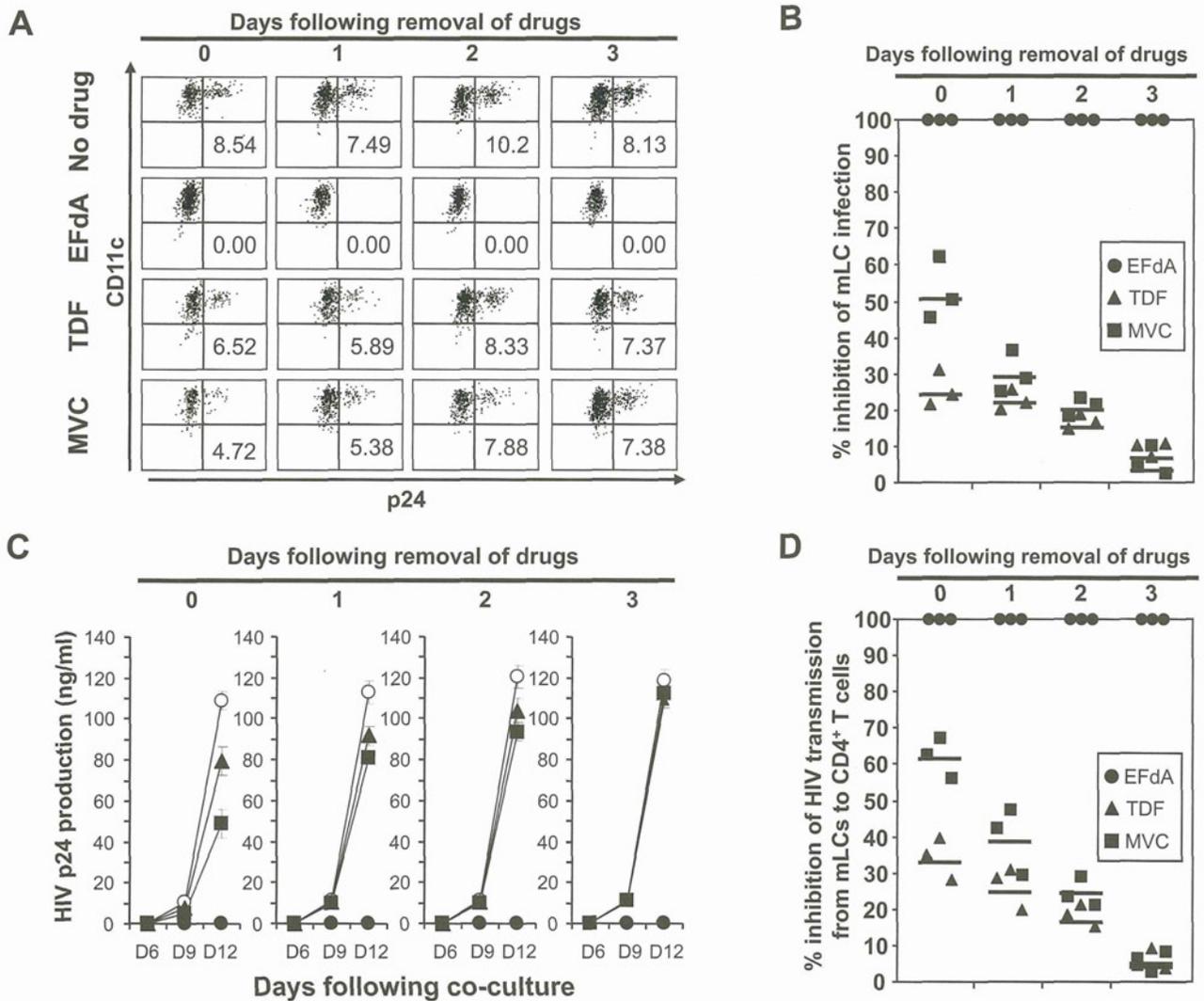


図2 EFdA、TenofovirおよびMVCによるmLCのHIV感染抑制効果の持続時間

F. 研究発表

1. 論文発表

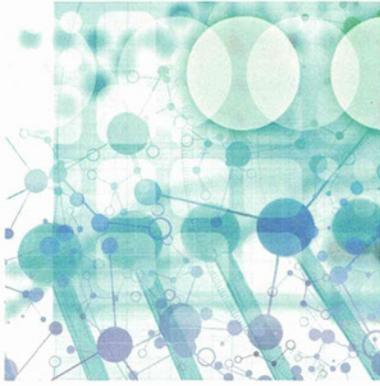
- 1) Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. Cell Host Microbe. 2013 Jan 16;13(1):77-86.

2. 学会発表

- 1) Kawamura T. Strategies for preventing sexual transmission of HIV. 13th KUMAMOTO AIDS Seminar, Oct 14, 2012.

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 東北メディカルメガバンク機構
東北大学病院 内科・総合感染症科 講師

研究要旨

本研究は、耐性HIVを克服するための耐性機序解明と創薬を目的としている。昨年は抗HIV剤の小動物評価系を確立させ、我々が創製したHIV侵入阻害を評価した。この方法は感染性HIVを動物に感染させる必要がなく、簡便・迅速かつ安全である。本年度は耐性機序の解明を中心に検討した。まず臨床分離株の解析から逆転写酵素阻害剤に対する耐性度に影響を与える polymorphism 172K/Rを見出した。172Kは thymidine associated mutations の効果を減弱させ、一方で Q151M による多剤耐性には影響を与えない。事実、Q151M を有する HIV に 172K が多く見られた。次に耐性HIVを強力に抑制しうる 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) に対する耐性機序の解明を行った。EFdA に対して、M184V に T165R/M などの変異を伴うことで約 30 倍耐性を獲得したが、活性値は AZT のそれよりも依然低く、耐性が出ても十分に抑制しうる薬剤であることを明らかとした。

A. 研究目的

強力な抗レトロウイルス剤や1日1回投与の薬剤の開発により、多剤併用であっても HIV 感染者における QOL は、劇的に改善されてきている。特に後者はアドヒアランスも良好になることからウイルスの効果的な抑制に役立ち、HIV 感染症の長期にわたる安全なコントロールにつながる。よってこれまでの予後予想を大きく上回る可能性まで導き出している。しかしコントロールされた状態であっても体内から HIV 自体は排除されていないため薬の飲み忘れや副作用によって治療が中断されてしまうと、その複製を許してしまい、耐性 HIV 出現の可能性を大きく高めてしまう。せっかくの薬効も耐性が獲得されてしまうとその効果を減弱させてしまい、結果、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がある。多剤耐性株の出現は、これまで使用されていない薬剤に対しても交差耐性を起こし、治療薬の選択を大きく狭めてしまう。本年度は新しい多剤耐性株の出現状況を検討するため、臨床分離株で見られた耐性変異を点突然変異法によって分子クローンで再

現することでその同定を試みた。

一方で新規薬剤、特に耐性株に効果を示すだけでなく1日1回の服用で十分な効果を示す薬剤の開発は、依然必要であり、これらの開発も本研究班において継続する。そのうちのひとつである日本たばこ共同開発された新規 HIV インテグラーゼ阻害剤、elvitegravir は 2012 年 9 月から米国 Gilead 社より販売が開始された。この薬剤は1日1回投与だけでなく、他の薬効成分も1剤の中に混合し、elvitegravir を含む抗 HIV 剤 3 剤とそれらの効果を増強させる薬剤 1 剤の混合剤になる。これまでの多数の薬剤の服用から解放され、たった1錠で多剤併用療法ができる画期的な薬剤である。日本においても 2013 年春にも販売が開始される予定である。

我々はこの elvitegravir 以外にも、1日1回投与の可能性をもつ薬剤 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) の開発にも携わっている。この薬剤は、逆転写酵素活性を阻害するにあたり、新しい作用機序である translocation を阻害する。そのため、これまでの耐性株だけでなく、多剤耐性株にも十分な効果を示す。この薬剤は 2012 年夏米国メルク社にライセンスされており、今後臨床治験が行われる可能性がある。HIV がこの新しい阻害機序に対してどの

ような耐性機序を獲得するかは今後の薬剤開発や臨床応用には欠かせない。我々は、EFdAに対する耐性ウイルスを *in vitro* で誘導し、その耐性機序を明らかにした。

B. 研究方法

- 1) 細胞とウイルス：MT-2はRPMI1640培地を用いて培養した。293T細胞、HeLa-CD4/ β -galactosidase (MAGI) 細胞はDMEM培地を使用した。ウイルスはHIV-1_{IIIIB} 株と HIV-1_{NL4-3} 株を用いた。HIV-1_{NL4-3} 株はプラスミドクローンであるpNL4-3とその組換え体を293T細胞に遺伝子導入して作製した。耐性変異を有する HIV-1_{NL4-3} 株は site directed mutagenesis 法によって構築した。プラスミドの作製では一般的な手技、試薬を使用した。これらのウイルスはそれぞれMT-2細胞で継代し、使用するまで-80℃で保存した。
- 2) 抗ウイルス剤：EFdAはヤマサ醤油株式会社にて合成した (Fig. 1)。AZT等のコントロール薬剤はSigma社から購入もしくはNIH AIDS Research and Reference Reagent Programから分与を受けた。
- 3) 薬剤感受性試験：薬剤感受性はMAGI細胞を用いた single round replication に対する抗ウイルス活性として測定した。

(倫理面への配慮)

耐性機序の解析と創薬応用を主とする基礎研究であり、臨床分離株など患者由来の情報は氏名、年齢、性別も含めて一切を研究に利用していないため特に配慮は要らないと考えられた。臨床分離株の塩基配列情報は、国立国際医療研究センターの倫理指針に基づいて解析された。また、ヒトゲノム・遺伝子解析やヒト幹細胞を用いた実験は行っていない。

C. 研究結果

1) 172K/R polymorphism：我々は172K polymorphismを有するウイルスBH10株由来のウイルスに site directed mutagenesis 法で thymidine associated mutations (TAMs) を導入した場合、臨床分離株のような高度AZT耐性が得られないことを経験していた。特に多剤耐性変異N348Iを導入した場合、そのAZT耐性が著しく低下する。172K/Rは野生型HIV株にひろく分布しており、その影響は軽微と考えられていたが、この172K/R存在下でTAMsのAZT感受性に対する影響をMAGI法で検討しところ、172KがM41L/T215YやN348Iの影響を有意に減弱させた。TAMに対する影響はAZTに限らず、excisionによって排出される薬剤すべてに共通して見られた (Fig. 2)。一方でQ151MやM184Vの効果は172K/Rでほとんど差がなく、exclusionに関連したAZT耐性には影響を与えない。Stanford University HIV drug resistance databaseにおいてもQ151M変異を有するウイルスでは172Kが導入されていることがあるが、TAMsを有するウイルスでは172Rが有意に増加していた。

N348IがNNRTIに対しても交差耐性を示すことから、172K/RのNNRTI耐性関連変異に対する影響を検討した。172KはNNRTI耐性に関しても減弱させることが明らかとなった (Fig. 3)。つまり、治療開始前に逆転写酵素領域に172Kを有するHIVは耐性化が遅くなる可能性があると考えられる。

2) EFdA耐性変異の同定：EFdAはM184Vで軽度耐性(約7倍)になることが、我々の研究によって明らかにされている。これまでEFdAの母核となるEdAによる耐性誘導を我々がおこなったところ、I142V/T165R/M184Vが同定できた。このウイルスに対する耐性度は30倍程度にとどまり、その活性値はAZTのEC50の絶対値よりも小さい値となる。その

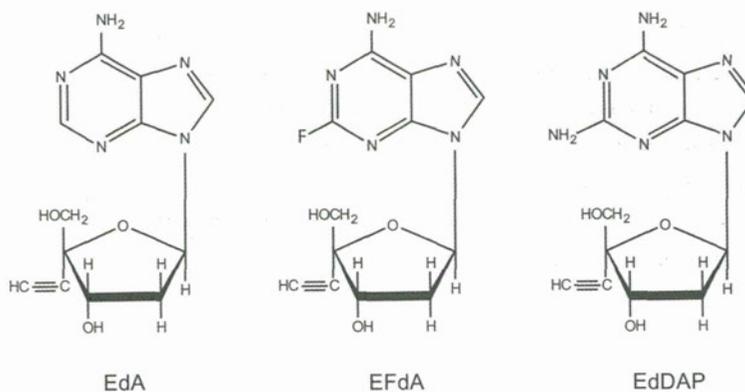


Figure 1 Chemical structure of 4'-ethynyl nucleosides

ため、我々はEFdAとその誘導体のEdDAPについて耐性誘導を行った。この誘導を約1年半程度行い、いくつかの耐性変異を同定した (Fig. 4)。M184Vとともに、A158T、T165R/Mが見出された。興味深いことにこの変異は、上記した172K/Rと同様に α -

helix Eの同一面に位置し、M184Vが位置する β -sheetとの関連が疑われた。今後この変異の意義について検討を進めていきたい。このことから今後EFdAが臨床試験に入った場合の耐性の獲得状況を推定することが可能になると思われる。

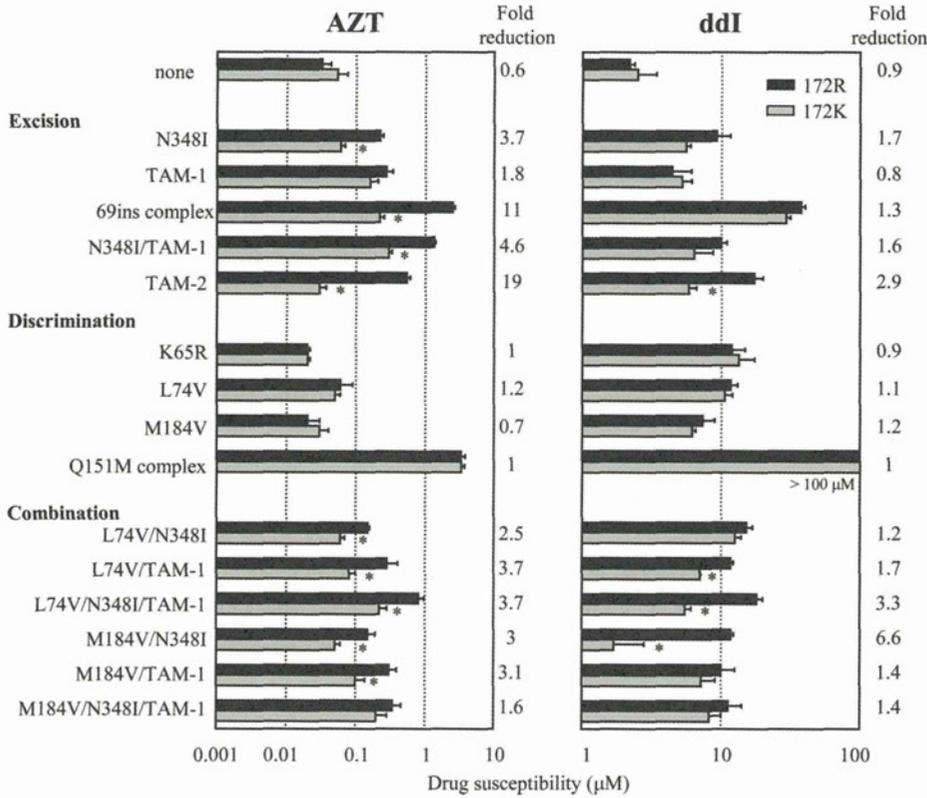


Figure 2 Effect of the 172K polymorphism on HIV-1 susceptibility to AZT and ddI.

Antiviral activities of HIV-1 carrying NRTI resistance mutations with 172R (black bars) or 172K (gray bars) were determined by MAGIC-5 cell-based assay and shown as the concentration required for 50% inhibition of virus infection (EC_{50}). "TAM-1 and -2" have the "M41L and T215Y" and "D67N, K70R, T215F, and K219Q" mutations, respectively. 69ins complex carries 69 insertion and TAM-1. Q151Mc complex carries Q151M, A62V, V75I, F77L, and F116V. Error bars represent standard deviations from at least three independent experiments. Asterisks mark statistically significant differences ($p < 0.05$ by t test) in EC_{50} values comparing 172K with 172R in the background of NRTI-resistant mutations. Susceptibility of the Q151Mc complex with 172R or 172K to ddI was not assessed because the EC_{50} values were over the detection limit for this assay ($>100 \mu\text{M}$).

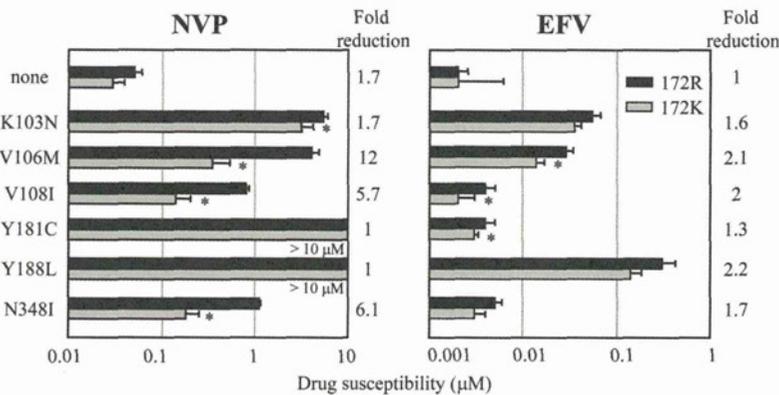


Figure 3 Effect of the 172K polymorphism on HIV-1 susceptibility to NVP and EFV.

Antiviral activities of HIV-1 carrying NNRTI resistance mutations with 172R (black bars) or 172K (gray bars) were determined by MAGIC-5 cell-based assay and shown as the concentration required for 50% inhibition of virus infection (EC_{50}). Error bars represent standard deviations from at least three independent experiments. Asterisks mark statistically significant differences ($p < 0.05$ by t test) in EC_{50} values comparing 172K with 172R in the background of NNRTI-resistant mutations. Susceptibilities of Y181C or Y188L with 172R or 172K to NVP were not assessed because their EC_{50} values were over the detection limit for this assay ($>10 \mu\text{M}$).