

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuzawa T, Kawamura T (Corresponding Author), Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 *Ex Vivo* Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J Invest Dermatol.* 2014 In press
- 2) Matsuzawa T, Kawamura T (Corresponding Author), Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S. Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV *ex vivo* infection of Langerhans cells within the epithelium. *J Invest Dermatol.* 2013 133(12):2803-5.
- 3) Aoki R, Kawamura T (Corresponding Author), Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. *J Invest Dermatol.* 2013 133(9):2170-9.

2. 学会発表

- 1) 川村龍吉. 話題の研究－骨と皮膚－抗HIV薬による新たな感染予防戦略. 第23回抗ウイルス療法研究会総会、ランチョンセミナー、2013/6、東京.
- 2) 川村龍吉. 平成25年度日本皮膚科学会皆見省吾記念賞. 第112回日本皮膚科学会総会、2013/06、横浜.
- 3) 川村龍吉. 教育講演：ウイルス感染と免疫との関わり－病態、疫学から治療応用まで－HIVの生体内侵入メカニズムと自然免疫との関わり. 第112回日本皮膚科学会総会、2013/06、横浜.
- 4) 川村龍吉. 亜鉛欠乏と皮膚炎－その驚くべきメカニズム－. 第12回皮膚科EBMフォーラム、2013/07、札幌.
- 5) 川村龍吉. 市民公開講座 紫外線による皮膚癌、～日光角化症を中心に～. 2013/07、甲府.
- 6) 川村龍吉. 抗HIV薬併用による新たな性行為HIV感染予防法の開発. 第15回白馬シンポジウム in 名古屋、2013/07、名古屋.
- 7) 川村龍吉. HIVの生体内侵入メカニズムと新たな感染予防戦略. 第37回阿蘇シンポジウム、2013/08、阿蘇.
- 8) 川村龍吉. 日光角化症に対するイミキモド外用療法の抗腫瘍効果発現メカニズム. 第29回皮膚悪性腫瘍学会、ランチョンセミナー、2013/08、甲府.
- 9) Tatsuyoshi Kawamura. The roles of Langerhans cell in acrodermatitis enteropathica and HIV infection. The 11th International Symposium of the Cutaneous

Biology Research Institute. 2013/09 Seoul.

- 10) 川村龍吉. シンポジウムIV 亜鉛イオン生命科学の最前線 亜鉛欠乏による皮膚炎の発症メカニズム. メタルバイオサイエンス研究会2013、2013/09、静岡.
- 11) 川村龍吉. 腸性肢端皮膚炎およびHIV感染初期におけるランゲルハンス細胞の役割. 北大皮膚科特別講演、2013/10、札幌.
- 12) 川村龍吉. HSVの基礎 up-to-date ー皮膚ヘルペス感染における宿主自然免疫応答の役割ー. 第6回HZ・S研究会、2014/01、東京.
- 13) 川村龍吉. HIVの生体内侵入メカニズムと新たな感染予防戦略. 第29回奈良県感染症研究会、2014/01、奈良.
- 14) 川村龍吉. 皮膚疾患と亜鉛、近畿亜鉛栄養治療研究会. 2014/02、大阪.

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

兎玉 栄一 東北大学大学院 医学系研究科・宮城地域医療支援寄附講座
東北大学病院・内科総合感染症科
東北大学 メディカルメガバンク機構・地域医療支援部門

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。初年度は抗HIV剤の小動物評価系を確立させ、昨年度は新薬開発のための耐性機序の解明を中心に検討した。本年度はこれらの成果から、さらなる薬剤開発のためのhigh through-put screening法の確立を目指した。これまで多く使用されてきたMTT法を中心とした細胞変性効果を利用した方法、レポーター遺伝子を利用した方法があるが双方に問題がある。今年度は後者において酵素反応を用いた場合の感度と精度に関して検討を行った。酵素法を用いた場合、侵入阻害剤はカウント法と同等であり、一方で侵入後の逆転写酵素阻害剤等では感度が上昇した。検出精度の差はなかった。また、 β -galactosidase検出系を利用することで、安定的なスクリーニングと経費の削減が可能であった。

A. 研究目的

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。このような多剤耐性株の出現は、使用歴の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。そのため新しい多剤耐性株の出現状況を把握し、その解析を行うことは新薬開発にも大きな意義がある。事実、我々のグループが開発に関与してきた薬剤はこれまでの耐性ウイルスに効果を示すものである。現在、本邦でもスタリビルドの1成分として使用されているelvitegravirは新しい阻害標的であるインテグラーゼを阻害することで耐性ウイルスを抑制する。他にも、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。EFdAは、逆転写酵素活性を阻害するにあたり、translocation阻害という新しい作用機序を有することから、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。EFdAは2012年夏米国メルク社にライセンスされており、現在前臨床試験が終了して今後臨床治験が行われる予定である。

このような薬剤は、新しいスクリーニング系を用いてアッセイされてきたことから、新薬開発にはア

ッセイ系の開発も併せて行う必要がある。これまで薬剤スクリーニング法として細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) を応用したMTT法やレポーター遺伝子を組み込み、感染をモニターするMAGI法などが開発されてきている。MTTは低CPEウイルスに対して対応が難しく、一方でレポーター法では、感染細胞をカウントする煩雑な作業や酵素活性の測定コストがかかるという問題点がある。これまでに我々はHIVに限らず、ヘルペスウイルスやアデノウイルスにもこのMTT法を応用し、一定の成果を上げているが、今年度は後者のMAGI法の改良を目的とした。大量の薬剤をスクリーニングするにあたり、測定コストは低い方がよく、またその精度と感度が問題となる。例えば、Fig. 1に示すように侵入阻害剤は侵入時だけでなく、出芽の際に表出されるgp160によって隣り合わせの細胞と融合も阻害する。逆転写酵素阻害剤のような細胞侵入後の薬剤は問題にならないが、複製後期過程にも関与する侵入阻害剤の効果はカウント法では反映されない。なぜならば、それぞれの感染フォーカスをカウントするため、その融合細胞の大きさは関係がないからである。しかしながら、酵素法ではこの抑制効果を酵素活性で測定するため、その影響が出てしまう可能性がある。

この点に関して検討はほとんど行われておらず、今後のスクリーニングの精度と感度の管理のために酵素法とカウント法の比較検討を行った。また、酵素法を取り入れた場合のコスト増加を最低限に抑えるための測定法を開発した。今年度はさらなる安全かつ効果的な薬剤開発のためのHTSシステムを構築し、今後のHIV診療に貢献できるように試みた。

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_{IIIb}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とその組替え体を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：吸着阻害剤であるDS5000、AZT等のコントロール薬剤はSigma社から購入した。融合阻害ペプチドは京都大学薬学部の藤井博士・大石博士らのグループから供与を受けた。非核酸系逆転写酵素阻害剤は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。具体的には、96ウエルプレートに10⁴/wellで細胞を加え、24時間培養したのちに薬剤とウイルスを添加し、48時間後にX-Gal添加で感染細胞を計測（カウント法）もしくはCPRGの添加で酵素活性の測定（酵素法）を行った。

(倫理面への配慮)

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。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) 酵素法とカウント法の相関：ウイルスを感染によって誘導される酵素活性量とカウント法で得られる感染価の比較検討を行った。その結果、相関がきれいに取れて問題がないことが明らかとなった。以前、我々はレポーター遺伝子として分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を用いてカウント法との比較を行ったが、基本的には強い相関がみられた。しかし、酵素法、とくに発光系ではない吸光度を利用した方法では、ウイルス感染価を明らかにするためにはおよそ300 MAGI unit (MU) が必要となり、約5倍の検出感度の低下が認められた (Fig. 2)。このことから以下の実験では300 MUを使用して薬剤感受性を検討した。

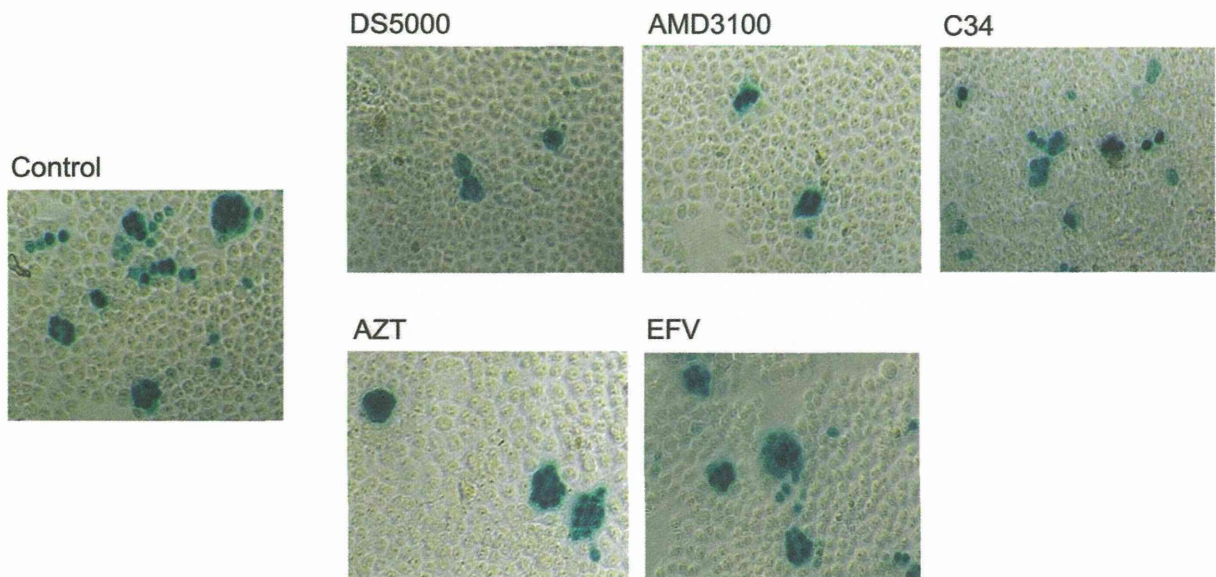


Fig.1 HIV-1感染細胞の顕微鏡下での状況

MAGI細胞にHIV-1_{IIIb}を感染させ、48時間後にX-Galで染色した。感染細胞が青く濃染されている。侵入阻害剤であるdextran sulfate Mw.5000 (DS5000)、CXCR4アンタゴニストであるAMD3100、融合阻害ペプチドであるC34はコントロールと比較して濃染された細胞の大きさが小さい。一方で逆転写酵素阻害剤であるazidothymidine (AZT) やefavirenz (EFV) はコントロールと同等である。

2) 代表的な抗ウイルス剤の効果判定：侵入阻害剤のカテゴリーに含まれるものとして、吸着を阻害するDS5000とウイルス融合を阻害するT-20を使用した。逆転写酵素阻害剤に含まれるものとして、核酸系逆転写酵素阻害剤、そして非核酸系逆転写酵素阻害剤を使用した。これらはすべて従来からのカウント法、及びに酵素法のいずれによってもその活性を検出することができた。この中で逆転写酵素阻害剤は酵素法で有意ではないがやや効果が増強 (Student's t-test: $P > 0.05$) されて判定されることがわかった (Fig. 3)。

3) 融合阻害剤の感受性：これまで臨床応用されたT-20とその誘導体、はじめに合成されたC34とその誘導体に関して検討を行った。これらの誘導体を含めて融合阻害剤は吸着阻害剤と同様にカウント法と酵素法で同等の検出感度を示した (Fig. 4)。

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、初年度はHIV感染症治療薬の効果判定のために小動物評価系を確立し、我々

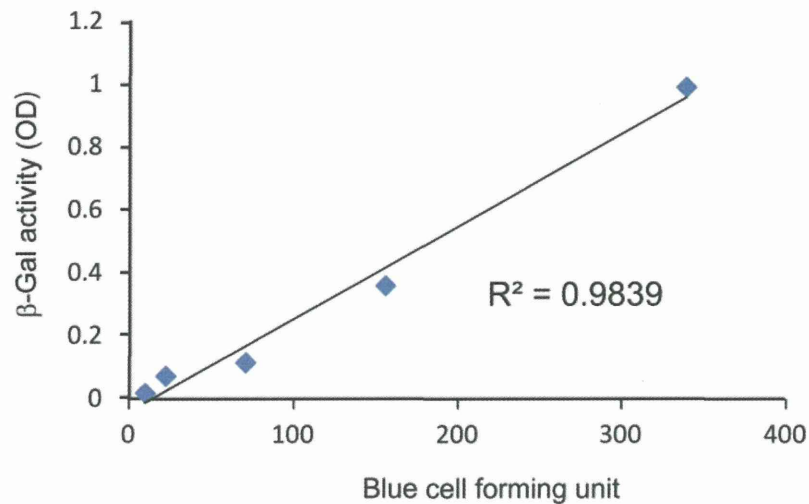


Fig.2 薬剤非存在下でのカウント法と酵素法との比較

MAGI細胞にHIV-1_{III}を感染させ、48時間後にカウント法はMAGI法に準じてX-Galで染色し、細胞数を計測、一方で酵素法はCPRGを反応させ、その後に吸光度計で測定した。縦軸に酵素活性、横軸に濃染された細胞数をプロットした。両者の相関性は良好であった。

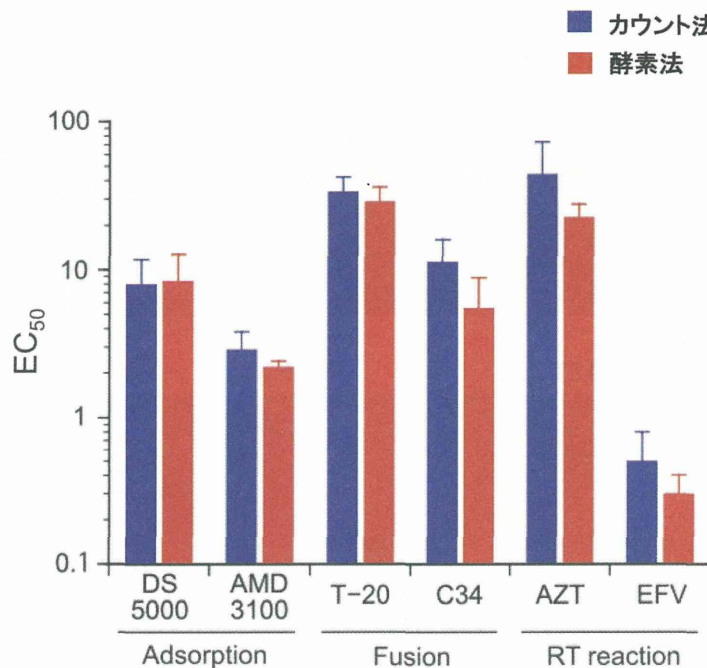


Fig.3 カウント法と酵素法との薬剤感受性の比較

MAGI細胞にHIV-1_{III}を感染させ、薬剤存在下で48時間後にカウント法はMAGI法に準じてX-Galで染色し、細胞数を計測、一方で酵素法はCPRGを反応させ、その後に吸光度計で測定した。カウント法であっても酵素法であっても感受性に大きな差は認められない。

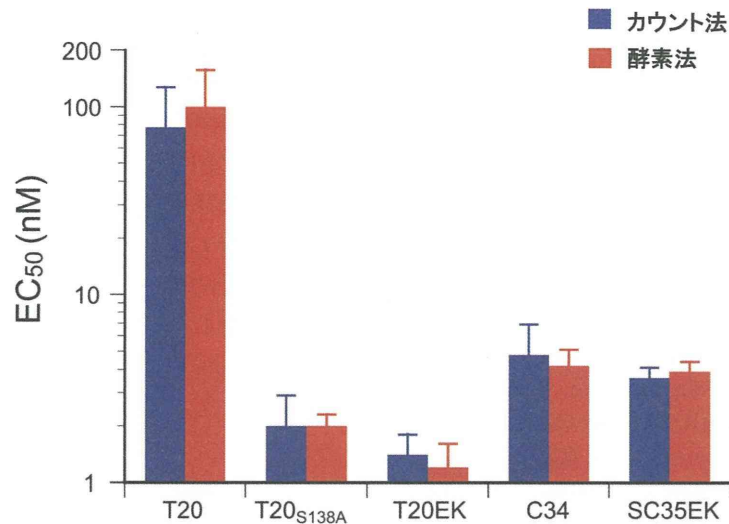


Fig.4 融合阻害剤での比較検討

MAGI細胞にHIV-1_{III}を感染させ、薬剤存在下で48時間後にカウント法はMAGI法に準じてX-Galで染色し、細胞数を計測、一方で酵素法はCPRGを反応させ、その後に吸光度計で測定した。カウント法であっても酵素法であっても感受性に大きな差は認められない。

のグループが創製したHIV侵入阻害剤の*in vivo*検討をした。その結果、*in vitro*で活性を示すものはラット血清中でもT-20同様に効果を示すことを明らかとしている。2年目は*in vitro*における評価を中心に行い、耐性変異の獲得に関連するこれまで注目されてこなかった172K/R polymorphismの解析と2012年にMerck社にライセンスされた核酸系逆転写酵素阻害剤EFdAについてその耐性変異と耐性HIVに対する活性を検討した。これらに引き続き、本年度はより効率的なスクリーニングを目指し、MAGI法の改善のための精度・感度の検討を行った。

酵素法とカウント法との違いとして、感染後半で引き起こされる合胞体形成ステップにおける阻害効果があげられる。このいわば2重に効果を示すことは、侵入阻害剤に特有な現象であり、酵素法では避けては通れない問題である。しかし、予想に反して酵素法とカウント法では差が見られなかった。一方で統計学的には有意差はないものの逆転写酵素阻害剤に代表される非侵入阻害剤はやや効果が強くなる傾向があった。これらを総合すると精度的にはほぼ同等であり、測定を変えても大きな問題には成りえないことが考えられる。

精度に関して統計学的に有意でなかったが、おそらくは300 MUという比較的高いウイルス価を使用したことが影響していると思われる。そのため、合胞体の大きさの問題が比較的影響を及ぼさなかったと考えられる。つまり、感染価が高いと隣の細胞も感染している可能性が高く、合胞体の大きさには限りが出てきると考えられ、その差が広がりにくかったものと思われる。

また、経費の問題でも luciferase のような発光系のものであれば感度は高いものの、測定試薬が高価であり、ルミノメーターなどの特殊な機器を要する。その点、酵素法でも吸光度を測定する方法では高価な試薬も機器も必要としないためより安価にまた研究環境にも影響されないことから有利な方法であると思われる。今後はこの方法をさらに応用して新たな測定系の確立に結び付けたい。

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*in vitro*評価系を確立させた。この方法を日本発の創薬に役立たせたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama. Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45:908-915, 2013.
- 2) Kazuki Shimane, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Shinya Oishi, Kentaro Watanabe, Yasuko Sakagami, Nobutaka Fujii, Kazuya Shimura, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan Sarafianos, and Eiichi Kodama. HIV-1 resistance mechanism to an electrostatically

- constrained peptide fusion inhibitor that is active against T-20-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:4035-4038, 2013.
- 3) Eleftherios Michailidis, Emily M Ryan, Atsuko Hachiya, Karen A Kirby, Bruno Marchand, Maxwell D Leslie, Andrew D Huber, Yee T Ong, Jacob C Jackson, Kamalendra Singh, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A Parniak and Stefan G Sarafianos. Hypersusceptibility Mechanism of Tenofovir-Resistant HIV to EFdA. *Retrovirology* 10:65 doi:10.1186/1742-4690-10-65, 2013.
 - 4) Atsuko Hachiya, Aaron Reeve, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Yee Ong, Karen Kirby, Maxwell Leslie, Shinichi Oka, Eiichi Kodama, Lisa Rohan, Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak, and Stefan Sarafianos. Evaluation of combinations of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine with clinically used antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 4554-4558, 2013.
 - 5) Kirby KA, Michailidis E, Fetterly TL, Steinbach MA, Singh K, Marchand B, Leslie MD, Hagedorn AN, Kodama EN, Marquez VE, Hughes SH, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effects of substitutions at the 4' and 2 positions on the bioactivity of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:6254-64, 2013.
 - 6) Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, Eiichi N Kodama, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* 19:179-89, 2014.
 - 7) Fusako Miyamoto and Eiichi N Kodama. Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry. *Current Pharmaceutical Design*, 19:1827-34, 2013.

2. 学会発表

- 1) Fusako Miyamoto, Fumiko Tomiyama, Kumi Kawaji, Mitsuo Kaku, Eiichi Kodama. Profile of a novel HIV reverse transcriptase inhibitor. NIH Tohoku University JSPS Symposium, Sendai, Japan, May 9-11, 2013.
- 2) 児玉栄一. MAGI細胞による薬剤 screening において酵素法がヒット化合物検出に優れる. 第27回日本エイズ学会学術集会、熊本、Nov. 20-22, 2013.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
 - 1) 児玉栄一 (京都大学・ヤマサ醤油株式会社と共同) エプスタイン・バールウイルス関連疾

- 患に対する薬剤およびそのスクリーニング法 特願2009-532175 特許5326173号 2008年9月8日出願 登録平成25年8月2日
- 2) 中国 (PCT出願) 同上 特許番号 2013092600196320 登録平成25年9月26日
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - 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

研究協力者

大出 裕高 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

シーエルセントリ (maraviroc: MVC) が薬剤耐性症例の治療に使用される際に適正に使用されるため、耐性機構の解析を行った。MVCのみをkey drugとする初回治療でウイルス学的治療失敗に至った2症例の解析を行ったところ、治療開始前に存在したCCR3/CCR5両指向性HIV-1の存在が主な原因であったことが強く推測された。現在、臨床で利用されている指向性検査のGeno2Pheno (G2P) やTrofile® (Monogram Biosciences社) ではCXCR4とCCR5のみしか検討されていない。MVCの適正使用のためにはHIV-1のco-receptor usageの基礎的理解がすすむ必要がある。現状ではCXCR4及びCCR5以外のco-receptor usageのHIVの存在も念頭に治療開始後のウイルス量の推移を慎重に検討する必要がある。

A. 研究目的

CCR5阻害薬のMVCは、初回治療または薬剤耐性症例のsalvage療法におけるkey drugとしてのみならず、副作用や他剤との相互作用の少なさからNRTI sparing regimenとしても有用な薬剤である可能性がある。MVCがHIV感染者の予後改善に貢献するためには、使用を検討している患者がCCR5指向性(R5) HIVに感染していることを的確に判断することが必要である。現在、遺伝子型検査であるGeno2Pheno (G2P) が用いられているが限界がある。そこで、平成24年度の研究においては指向性表現型検査を実施するためことを目的に、Gateway cloning systemを用いて臨床検体由来env領域をもつrecombinant HIV-1作製系およびNP-2 cell lineを用いた指向性表現型検査法(NMC法)を確立した。実際に、G2PでCXCR4指向性(X4)と判定された中にも実際はR5である症例があり、薬剤耐性症例に対する治療の選択肢を増やすことができる可能性を示した。

一方、MVC使用症例については、他剤と同様に、治療経過において効果が不十分な場合、薬剤耐性の獲得の有無を評価することが必要である。MVCが十分なHIV複製抑制効果を示さなかった原因を精査

することにより、MVCの適正使用に必要な知見が得られる可能性がある。我々は、初回治療にMVCをkey drugとした治療を行いウイルス学的失敗に至った2症例を経験した。そこで、平成25年度の研究では、MVC適正使用に関する知見を得ることを目的とし、これまでに確立した表現型検査法を用いてMVC感受性が治療経過に与えた影響を検討した。

B. 研究方法

1. 対象症例

MVCをkey drugとして使用して初回の抗HIV療法を行い、奏功した3例とウイルス学的治療失敗に至った2例(図1)。治療失敗2症例の臨床経過を図2に示す。

2. 検体と塩基配列の決定

患者血漿中から抽出したHIV genome RNAおよびPBMCから抽出したproviral DNAを鋳型として、env領域をPCR法で増幅しpFG02 Rlucに組み込み、各検体からそれぞれ6クローンの組換えHIV-1を作製した。全てのクローンについてenv全長の塩基配列を決定した。さらにenv全長のsequenceをもとにMEGAを用いて系統樹解析を行った。

3. 指向性検査

遺伝子型検査法はG2Pを用いてV3領域の塩基配列から指向性を決定した。表現型検査は、臨床検体由来 *env* 全長を有する組み換え HIV-1 を作製し群馬

大学星野博士、清水博士より供与いただいた NP-2 cell に感染させて指向性を決定した (NMC法: 図3)。指向性は、これまでの CXCR4、CCR5 に加えて CCR3、CXCR1、CXCR2、CXCR5、BLR1、CCR1、CCR6、CCR8、Duffy NP-2 についても検討を行った。

(a) ウイルス学的治療失敗例

症例	年齢	性別	病期 ^{*1}	発症・併存疾患	導入ARV	CD4 ^{*2}	Viral load ^{*3}	FPR
1	30	M	C3	髄膜炎	TVD+MVC	69	>1.00x10 ⁷	95.5
2	55	M	B3	髄膜炎	TVD+MVC	18	1.18x10 ⁶	96.2

(b) 治療成功例

症例	年齢	性別	病期 ^{*1}	発症・併存疾患	導入ARV	CD4 ^{*2}	Viral load ^{*3}	FPR
1	36	M	C3	静脈洞血栓症疑い	TVD+MVC	54	1.54x10 ⁵	15.0
2	60	M	C3	トキソプラズマ脳症	ABC+3TC+MVC	54	1.97x10 ⁵	99.2
3	45	M	B2	アメーバ腸炎	TVD+MVC	316	1.20x10 ⁴	45.1

#1 CDC分類, #2 / μL, #3 copies / mL

図1 MVCのみをkeyとした初回治療を行った症例

全部で5症例に対し、MVCのみをkey drugとする抗HIV療法を行った。(a)にはウイルス学的治療失敗に至った2例、(b)には治療成功した3例の患者の状況を示す。FPRはV3領域のdirect sequenceの結果から算出したものを示す。全例、治療開始前に薬剤耐性遺伝子型検査が実施されており、プロテアーゼ、逆転写酵素およびインテグラーゼ領域に薬剤耐性関連変異を認めなかった。

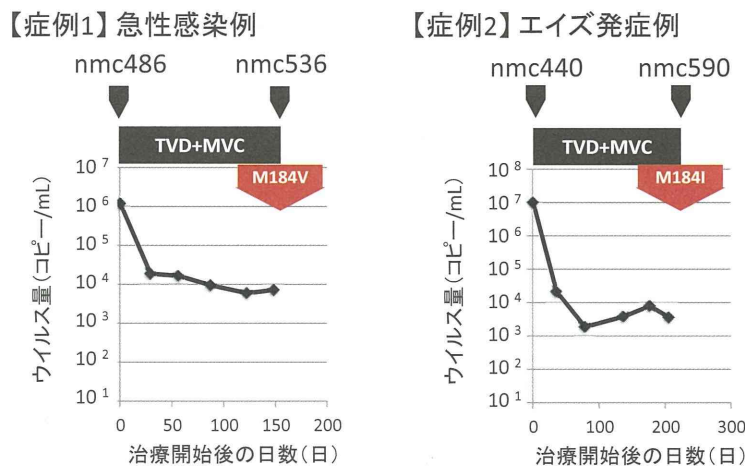


図2 ウイルス学的治療失敗症2例の経過と検討に使用した検体

症例1、2とも治療開始前およびウイルス学的治療失敗に至ったと判断した時点で採血を行った。採血ポイントと検体番号を図中に示す。治療開始前後の血漿中のHIV genome RNAを鋳型として、薬剤耐性遺伝子型検査を行ったところ、治療開始後の検体からRT領域にFTC耐性関連変異を検出した。

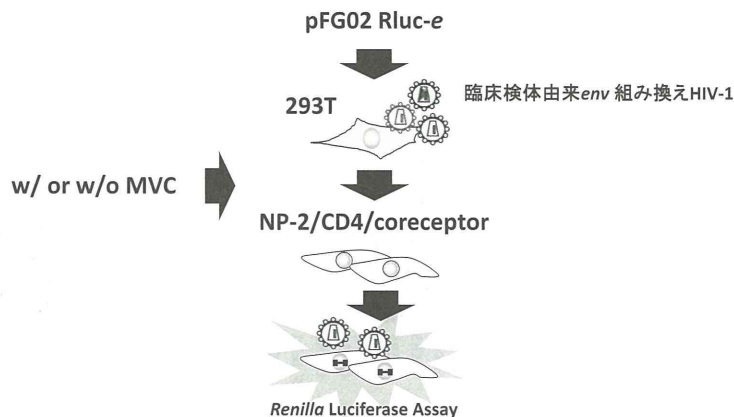


図3 NP-2 cell lineによるHIV-1 *env*表現型検査 (NMC法)

症患者の血漿中のHIV genome RNAを鋳型にして *env* 全長を含む領域を増幅し、pFGO2Rlucに組み込む。作製したベクター (pFGO2Rluc-e) を293Tにtransfectionして組換えHIV-1を作製し、種々のco-receptorを発現するNP-2 cell lineに感染させ、Renilla luciferase活性で感染の有無を評価した。MVCの感受性試験は種々の濃度のMVC存在下に感染実験を行い、阻害曲線を作製してIC₅₀を算出した。

4. MVC感受性検査

CCR5およびCCR3発現NP-2 cell lineに様々な濃度のMVC存在下に組換えHIV-1を感染させ、IC₅₀を決定する。

(倫理面への配慮)

検体はインフォームドコンセントを得て採取した。また、検体は連結匿名化し、個人が特定されないように配慮した。

C. 研究結果

1. ウイルス学的治療失敗例の解析

治療失敗例の2症例の臨床状況、治療レジメンおよび初診時検査所見を図1-aに示す。同時に実施したenv V3領域のdirect sequenceをもとにしたG2PのFPRは症例1で95.5%、症例2で96.2%であった。これら2症例の治療開始後の検体の薬剤耐性遺伝子型検査の結果、RT領域にそれぞれM184V、M184I変異が検出された(図2)。

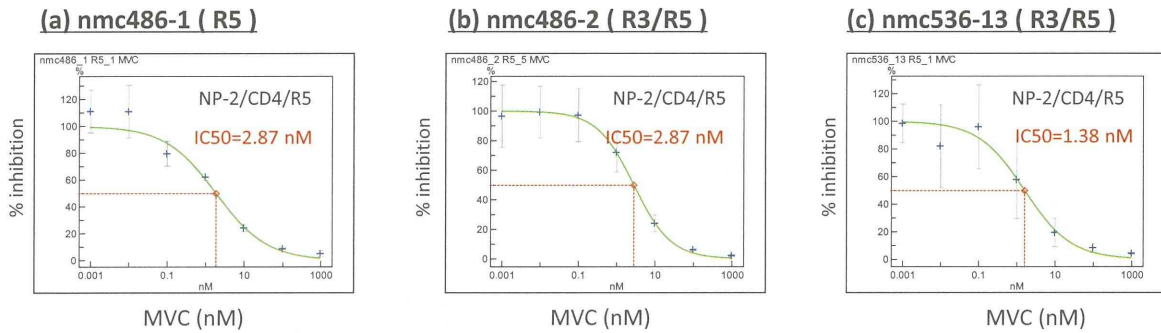


図4 MVC感受性表現型検査

代表的な結果を示す。抗HIV療法開始前にCCR5指向性、CCR3/CCR5両指向性のenvが認められたが、IC₅₀は実験室株のJRFLのIC₅₀(4.67 nM, 95% CI 3.08-6.26)と有意な差はなかった。治療後のCCR3/CCR5両指向性のenvをもつHIVのIC₅₀は治療前と有意な変化はなく、maximum percentage of inhibition (MPI)の低下、すなわち、plateau effectも認めない。

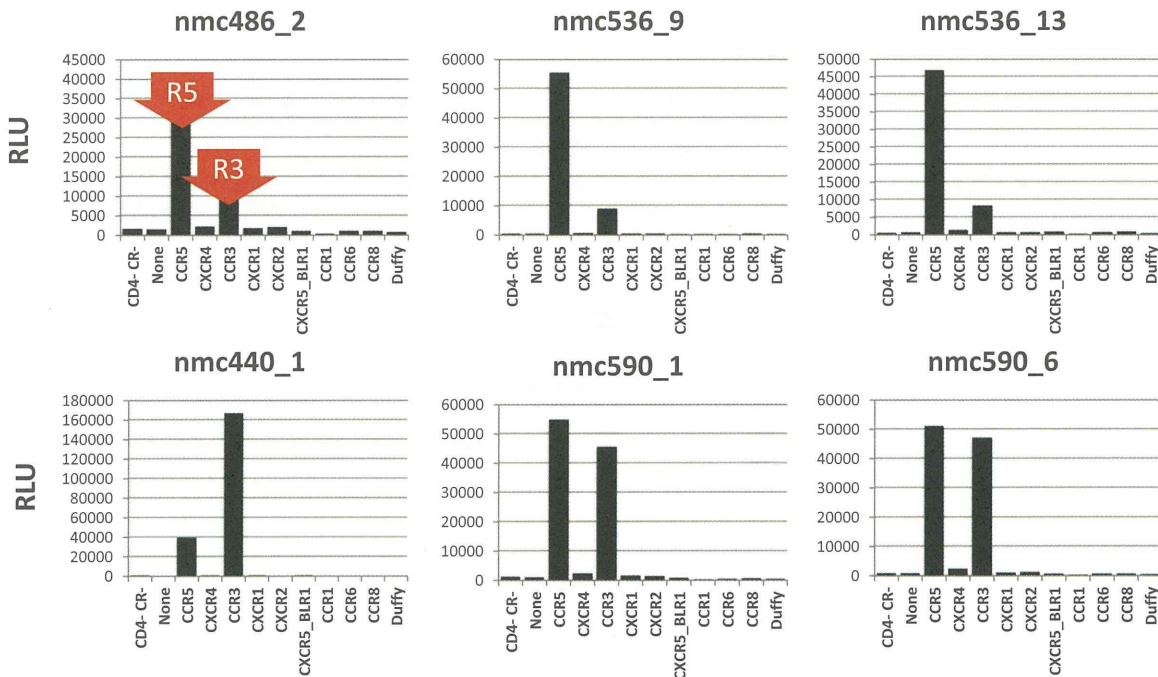


図5 NP-2 cell lineによる指向性検査

種々のco-receptorを発現するNP-2 cellを用いて、作製した組換えHIV-1の指向性を検討した。治療失敗2例の治療前後から分離されたenvを有する組換えHIV-1の中に、CCR3をco-receptorとして感染するクローンが認められた。代表的なクローンの感染実験の結果を示す。

NMC法による表現型検査を実施するため、両症例の治療前後に採取した血漿中のHIV-1 RNAからそれぞれ6クローンずつ、合計24クロンの組換えHIVを作製した。CXCR4およびCCR5発現NP-2 cellを用いてMNC法により指向性を判定したところ、判定可能なクローンは全てR5指向性であった。MVCの感受性試験を行ったところ、検討したクローンは全てreferenceとして用いたJRFLと同等の IC_{50} を示し、plateau effectも認められなかった(図4)。

CXCR4およびCCR5以外の指向性の可能性を考え、種々のco-receptorを発現しているNP-2 cellを用いて検討したところ、両症例、治療前後でCCR5に加えてCCR3を発現するNP-2 cell lineへの感染が認められた(図5)。MVCはこれらのウイルスのCCR3発現NP-2への感染を阻止しなかった。

治療失敗2症例の指向性検査およびMVC感受性検査の結果を図6-aにまとめる。

(a)	Clone	Geno2Pheno(G2P)		NMC法		
		FPR	判定結果	判定結果	MVC IC_{50} (nM)	
					NP-2/CD4	
					R5	R3
NMC486_1	68.8	R5	R5	1.89	N.D.	
NMC486_2	96.2	R5	R5/R3	2.87	>1000	
NMC486_3	96.2	R5	-	-	-	
NMC486_5	96.2	R5	-	-	-	
NMC486_6	60.1	R5	R5	3.03	N.D.	
NMC486_8	96.2	R5	R5	1.34	N.D.	
NMC536_9	96.2	R5	R5/R3	6.21	>1000	
NMC536_10	96.2	R5	R5/R3	1.07	>1000	
NMC536_11	72.4	R5	-	-	-	
NMC536_12	72.4	R5	-	-	-	
NMC536_13	96.2	R5	R5/R3	1.38	>1000	
NMC536_14	96.2	R5	-	-	-	
NMC440_1	5.8	X4	R5/R3	1.26	>1000	
NMC440_2	95.5	R5	-	-	-	
NMC440_3	95.5	R5	R5	-	-	
NMC440_7	95.5	R5	R5	3.9	N.D.	
NMC440_8	95.5	R5	R5	-	-	
NMC440_9	95.5	R5	-	-	-	
NMC590_1	22.4	R5	R5/R3	-	-	
NMC590_2	99.2	R5	R5	2.56	>1000	
NMC590_3	22.4	R5	-	-	-	
NMC590_4	22.4	R5	-	-	-	
NMC590_5	22.4	R5	R5/R3	-	-	
NMC590_6	22.4	R5	R5/R3	1.89	>1000	

(b)	Clone	Geno2Pheno(G2P)		NMC法	
		FPR (%)	判定結果	判定結果	MVC IC_{50} (nM)
					NP-2/CD4/R5
NMC426_1	45.1	R5	R5	2.23	
NMC426_2	45.1	R5	-	-	
NMC426_3	45.1	R5	R5	2.27	
NMC426_4	45.1	R5	-	-	
NMC426_6	45.1	R5	-	-	
NMC426_8	45.1	R5	R5	2.93	
NMC428_1	82	R5	R5	-	
NMC428_3	45.1	R5	-	-	
NMC428_4	38	R5	R5	6.51	
NMC428_6	45.1	R5	R5	6.48	
NMC428_7	82	R5	-	-	
NMC428_8	45.1	R5	-	-	
NMC480_9	99.2	R5	R5	8.15	
NMC480_10	99.2	R5	-	-	
NMC480_11	99.2	R5	R5	-	
NMC480_12	99.2	R5	-	-	
NMC480_13	99.2	R5	R5	9.38	
NMC480_14	99.2	R5	-	-	

図6 分離したクローンの指向性、MVC感受性

(a) 治療失敗2例の治療開始前後、(b) 奏功例3例の治療開始前の血漿からそれぞれ6クロンの組換えHIV-1を作製し、G2PおよびNMC法で指向性、MVC感受性を決定した。治療失敗例では治療後にCCR3/CCR5両指向性を示すクローンの割合が増加した。MVCの IC_{50} も治療前後で変化はなかった。治療奏功例ではNP-2 cell lineで評価可能な感染性を有するクローンはすべてR5単独の指向性を示し、MVCの IC_{50} も実験室株のJRFLの IC_{50} (4.67 nM, 95% CI 3.08-6.26) と同等であり、臨床経過によく合致する結果であった。