

Fig.3 Dose-escalating induction of EFdA- or EdDAP-resistant HIV-1.

HIV-1_{III}B was independently passaged in MT-2 cells in the presence of increasing concentration of EFdA (A, B) or EdDAP (C, D). At the indicating passages, proviral DNA from the lysates of infected cells was sequenced. EC₅₀ values of HIV-1 variants were determined using the MAGI assay and degree of resistance (n-fold of the EC₅₀) compared to HIV-1_{wt} is shown in parentheses.

してみたが、その耐性に及ぼす影響は軽微であった。そのため、EFdAは現在蔓延しているほとんどの耐性株に有効であることが予想される。

3) スクリーニング法の確立：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。侵入阻害剤の複製後期効果はそれぞれの感染フォーカスをカウントするカウント法では反映されない。しかし、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ため、スクリーニング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。その結果、相関は保たれていたが、酵素法において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 MIAGI 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。

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やや効果が強いということが見られた (Fig. 4)。

4) 動物モデルの確立：バックグラウンドを検討するため、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ところネガティブコントロールの血清中にも非特異的抗HIV-1_{III}B効果が認められた (Fig. 5)。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。T-20EK/S138Aは次世代型融合阻害剤としてEK motifを導入したT-20に、さらに耐性関連変異を導入して耐性株への効果増強を図ったペプチドであり、200倍程度の増強作用があるが、効果持続は約12時間でT-20と同等の血中安定性を有していた。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T-20に及ばなかった。抗HIV-1_{Ba-L}効果を検討したところ、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アンタゴニスト以外はHIV-1_{III}Bと同等であった。

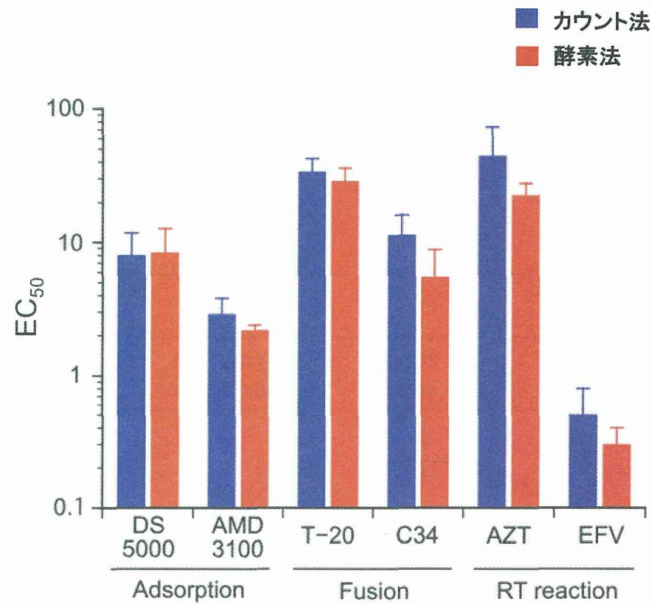


Fig.4 Sensitivity in anti-HIV assays by counting and enzymed based methods. MAGI cells and HIV-1_{IIB} were employed. In the presence of drugs for 48 h, MAGI cells were stained with X-Gal for counting or incubated with CPRG for enzyme activity detection .

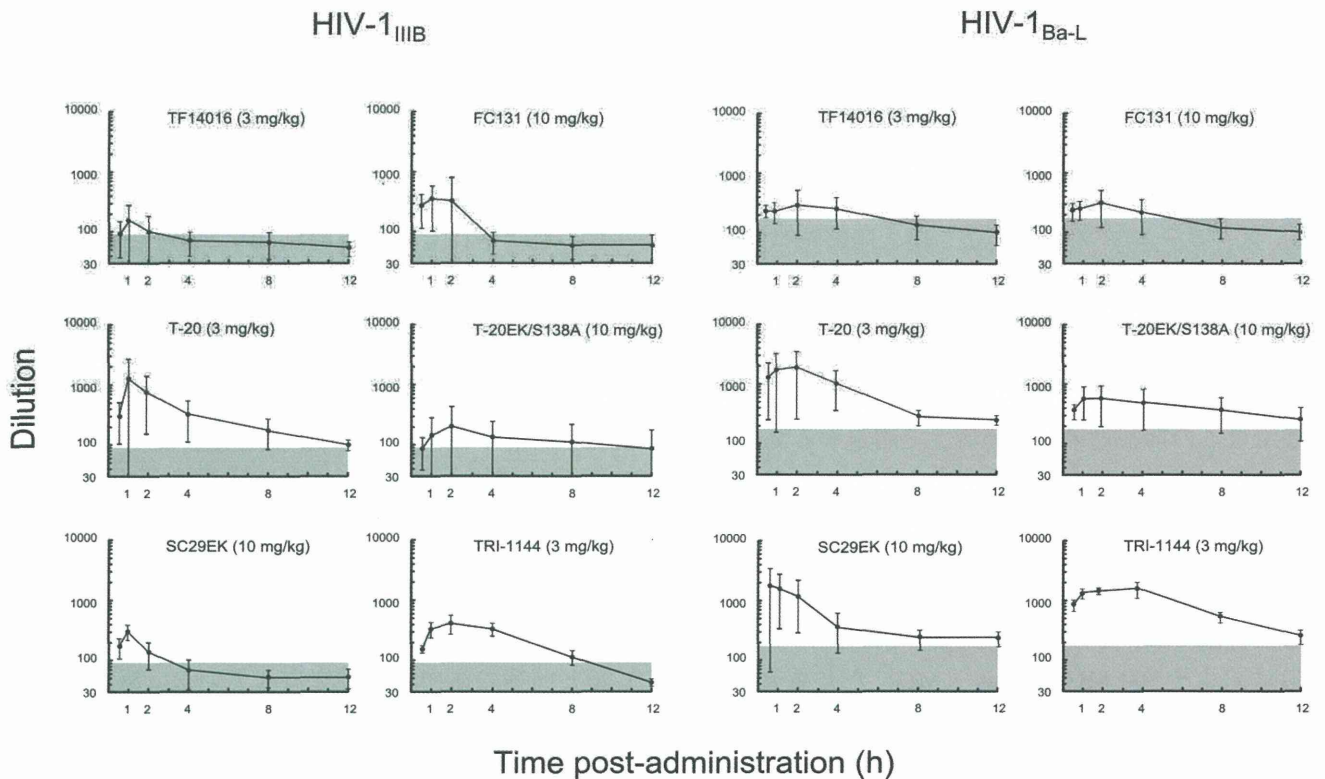


Fig.5 Anti-HIV-1 activity of drugs *in vivo*. Six groups of 6 rats were administrated with each drugs by intra-peritoneal injection, and then rat sera were harvested at different time points post-administration. All serum samples were detected by the MAGI assay for 50% inhibition of infections of HIV-1_{IIB} and HIV-1_{BAL}. 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.

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。

172K/Rはサブタイプを越えて広く観察されるpolymorphismであるが、K (Lys)はAAAでコードされ、R (Arg)はAGAでコードされる。R (Arg)のほうが頻度は高く、あえて言うならR (Arg) - AGAがWTと言えるかもしれない。このAGAが例えばapobec3G/3Fによって逆転写中のcDNAのシトシンがdeaminationされるとするとK (Lys) - AAAとなると考えられる。核酸配列の特性からすればVifによる回避ができないapobec3FによってAAAに変換され、また複製速度もほとんど変わらないため、特に不都合もなく広く分布したものと思われる。

本研究で行われたように、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。この感度の変化に関しては、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、その差が大きくな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この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。

本ラット評価系の特徴として、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

であるマウスでは採血回数を増やすことができないため、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薬剤の投与量を減らすことも可能である。ラットは6匹投与しても薬剤は10 mg以下と少量で実験が行うことができる (10 mg/kgで行った場合)。この血清をいろいろなHIV株に試すことも可能で、臨床分離株に対しても対応可能である。

今回使用した薬剤は、CXCR4アンタゴニストと融合阻害剤でどちらもペプチド製剤であった。本来は非働化してから計測することも望ましいかもしれないが、タンパク吸着が不可逆性になってしまうこと、また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。また生理的な薬剤の動態を知るうえでは非働化をしないほうがいいと思われた。また非働化によっても血清濃度が高い場合、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。血清を1,000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。

E. 結論

耐性HIVを克服するための新薬の創製を目的とし、本研究期間に新規抗HIV阻害剤の迅速かつ簡便な小動物評価系の確立、*in vitro*評価系、EFdAの耐性誘導、新規耐性変異の評価を行った。これらの情報はさらなる薬剤開発に有用であると思われる。

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*, S2:004. doi: 10.4172/2155-6113. S2-004 2012.
 - 8) Ryo Masuda, Shinya Oishi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Akira Hirasawa, Gozoh Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii. Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives. *Future Medicinal Chemistry* 4:837-844, 2012.
 - 9) Xiaoguang Li, Hua Qian, Fusako Miyamoto, Takeshi Naito, Kumi Kawaji, Kazumi Kajiwara, Toshio Hattori, Masao Matsuoka, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Eiichi N. Kodama. A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424:257-261 2012.
 - 10) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Krzysztof Palczewski, 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. *Journal of Biological Chemistry* 287:29988-29999, 2012.
 - 11) Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG. Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348i, a connection subdomain drug resistant HIV-1 reverse transcriptase mutant. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 58:187-195, 2012.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.

- 19) Shigeyoshi Fujiwara, Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi Kodama, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatrics International*, 54: 159-166, 2014.

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. 18th 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. 12th 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. 12th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Hershey, Pennsylvania, Nov 6-9, 2011.
- 4) Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Eleftherios Michailidis, Eiichi N. Kodama, Michael A Parniak, Hiroaki Mitsuya, Shinichi Oka, Stefan G Sarafianos. The Combination of 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine with Rilpivirine Shows Synergistic Anti-HIV-1 Activity In Vitro. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo Apr16-19,2012.
- 5) Eleftherios Michailidis, Jordan Wilkins, Emily M. Ryan, Atsuko Hachiya, Eiichi N. Kodama, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Stefan G. Sarafianos. Effect of 4'- and 2'-NRTI Substitutions on the Inhibition Mechanism of HIV Reverse Transcriptase and Toxicity. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo Apr16-19, 2012.
- 6) Fusako Miyamoto, Kumi Kawaji, Toshio Hattori, Hiroaki Mitsuya, Stefan G. Sarafianos, Eiichi N. Kodama. Sustained Activity of 4'-Ethynyl Nucleosides to Variants with M184V Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo. Apr16-19,2012.
- 7) Masahiro Watanabe, Koichi Hashimoto, Yusaku Abe, Eiichi Kodama, Ryota Nabika, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Mitsuaki Hosoya. A novel peptide derived from measles virus fusion protein inhibits the replication of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus *in vitro* and *in vivo*. 25th International Conference on Antiviral Research. Sapporo, Apr16-19, 2012.
- 8) Eiichi Kodama. Recent development of anti HIV-1 agents and their resistance. Center for AIDS Research Seminar. Kumamoto, May21, 2012.
- 9) Eiichi Kodama. 抗HIV薬・抗ウイルス薬の基礎開発について. ヴィーブヘルスケアセミナー、東京、May 28, 2012.
- 10) 服部俊夫、鈴木定彦、山岡昇司、井戸栄治、一瀬休生、仲宗根正、久保 亨、臼澤基紀、垣本和弘、福本 学、児玉栄一. サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワーク構築の試み. 第27回日本国際保健医療学会学術大会、Okayama, Nov 3-4, 2012.
- 11) 宮本総子、満屋裕明、児玉栄一. EFdAおよびEdDAPに対する耐性変異が耐性度と複製能力に及ぼす影響. 第26回日本エイズ学会学術集会、Yokohama, Nov 3-4, 2012.
- 12) 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, 2012.
- 13) 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・バーウイルス関連疾患に対する薬剤およびに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

薬剤耐性症例に対する治療の研究として、知見に乏しい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 (MVC) の適正利用のため、指向性の表現型検査法 (NMC法) を確立した。遺伝子型検査であるGeno2Pheno法でFPR低値によりCXCR4指向性と判定されても実際はCCR5指向性でMVCの有効性が期待できる症例があることが示された。また、MVC使用時のウイルス学的治療失敗の原因として、現在、使用前に検討の対象とされていないCCR3指向性HIV-1の関与が強く示唆された。

A. 研究目的

1. non-subtype B HIV-1 のプロテアーゼ阻害剤感受性評価に対するvirus like particle (VLP) ELISA法の有用性の検討

新規抗HIV薬の開発により、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が、薬剤耐性症例に対する治療には、適切な薬剤感受性のデータに基づく抗HIV薬の選択が必須条件である。多くの場合、薬剤耐性遺伝子型検査の結果と服薬履歴とウイルス量の変化などの情報に基づき薬剤の選択を行えばよい。しかしながら、non-subtype B 薬剤耐性HIV-1の耐性変異に関する知見は限られている。そこで、薬剤耐性変異高度蓄積HIVプロテアーゼよりも更に知見の限られるnon-subtype B HIV-1プロテアーゼの薬剤感受性試験への有用性を検討する。

2. maraviroc (MVC) 適正使用のためのHIV-1指向性表現型検査法 (NMC法) の確立

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。使用に際してはCCR5指向性を確認することが必要である。現在、日本では指向性検査として遺伝子型検査であるGeno2Pheno法 (G2P) が用いられているが、知見が限られる。そこで、HIV-1指向性表現型検査法 (NMC法) を確立する。

3. MVC適応症例決定に対するMNC法の有用性の検討

HIV-1遺伝子型検査であるG2Pでは、false positive rate (FPR) を指標にして指向性を推定する。しかしながら、cut offは明確には定まっておらず、non-subtype B HIV-1での実用性を含め、その妥当性にはまだ知見の蓄積が必要である。臨床現場では、薬剤耐性症例や副作用で他剤の使用が困難症例では、G2Pで低いFPR値が示されMVCの使用を躊躇することが少なくない。そこで、G2PでFPRが10%未満を示した患者の検体を用いてNMC法による指向性表現型検査を行い、MVCの適応の有無を検討する。

4. MVCを用いた治療のウイルス学的治療失敗の機序解明

MVCを治療に用いてウイルス学的治療失敗に至った場合、薬剤耐性獲得の有無の評価が必要である。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、NMC法を用いてHIV-1指向性およびMVC感受性等を詳細に検討し、MVCの有効性が治療経過に与えた影響を検討し、ウイルス学的治療失敗をもたらした要因を解析する。

B. 研究方法

1. HIV-1 プロテアーゼ表現型検査 (VLP ELISA法)

患者の血漿から得た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。DRV、LPVに対するIC₅₀を求めた。HXB2 proteaseのIC₅₀に対する比を算出し、Fold resistanceとして感受性を評価した(図1)。遺伝子型検査としては

major cloneを選択しthe Stanford HIV Resistance Databaseを用いてGenotypic susceptibility score (GSS)を算出した。

2. 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、前医にてABC+3TC+LPV/rによる抗HIV療法が開始されたが治療失敗し、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 /μL (CD4% 20)、viral load 4.10 × 10⁴ copies / mL。母親は転院時未治療でCD4 count 49 / μL、viral load 5.11 × 10⁵ copies / mLであった。

3. HIV-1 指向性表現型検査 (NMC法)

臨床検体由来 env全長を含む領域をクローニングし発現可能なconstructであるpFG01と組換えHIV-1作製用constructであるpFG02 Rlucを構築した(図2-a)。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法で増幅した。Gateway BP反応を用

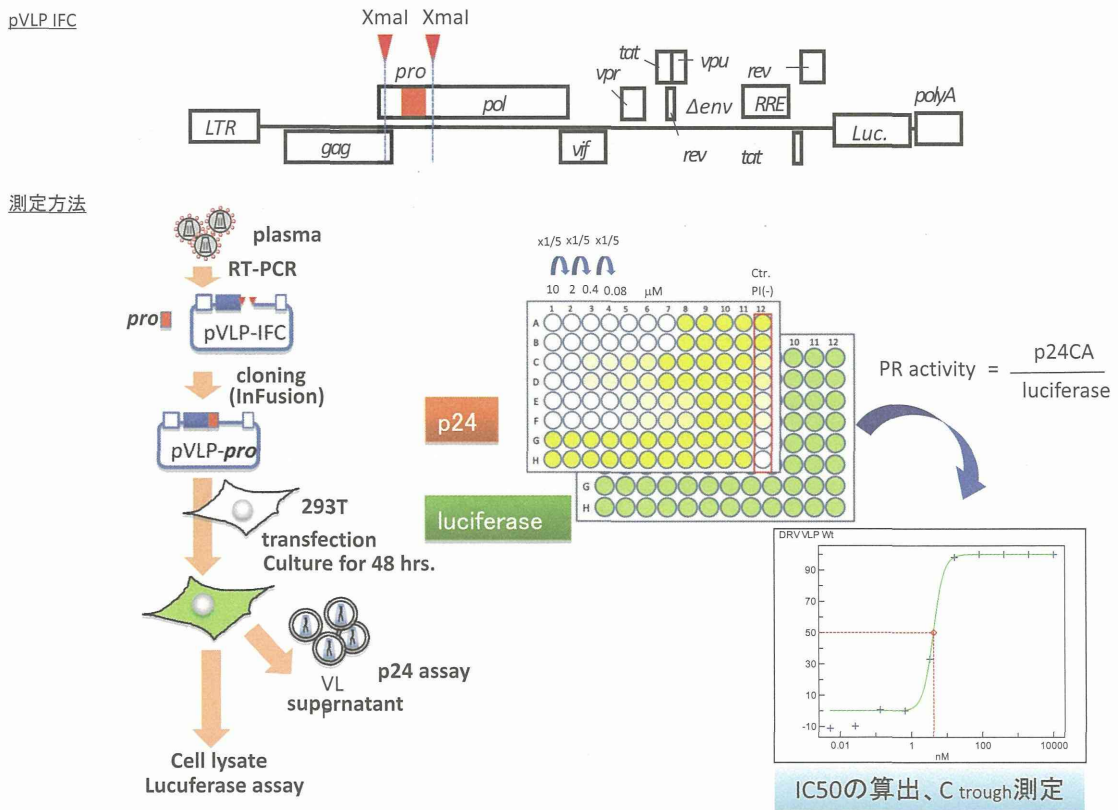


図1 VLP ELISA法の概略

血漿中のHIV-1 genome RNAからprotease領域を増幅し、pVLP INFにInFusion systemを用いてクローニングする。293T細胞にtransfectionし、上清中のp24、cell lysate中のluciferase活性からprotease活性を評価する。96穴プレートを用いて感受性検査を実施し、IC₅₀を算出する。

いて、pFG01にクローニングし、sequence解析を行った。さらにGateway LR反応を用いてpFG01からpFG02 Rlucにenv領域をcloningした(図2-b)。これを、293T細胞にtransfectionし、recombinant HIV-1を含む培養上清を得た。これを、種々のco-receptorを

発現しているNP-2細胞に感染させ、36時間後にcell lysateを調整しRenilla luciferase活性を測定し、感染の有無を評価した(図2-c)。

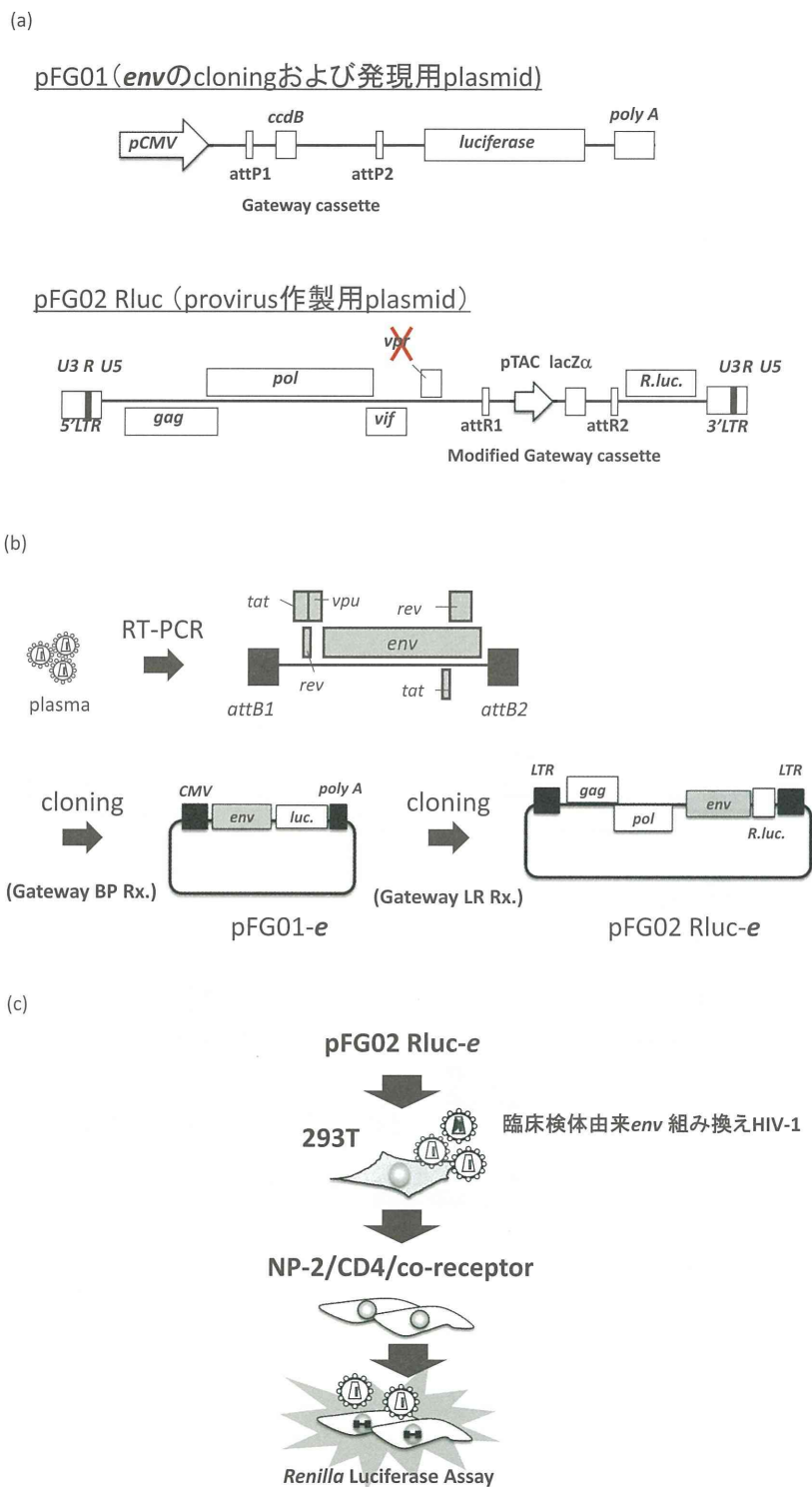


図2 HIV-1指向性表現型検査法であるNMC法
 (a) Construct, (b) 臨床検体由来env全長を含む領域のGateway cloning systemを用いた組み込み反応、(c) NP-2 cell lineを用いた表現型検査方法

4. G2PおよびMNC法の妥当性を評価するために用いた検体

MVC適応症例決定に対するMNC法の有用性の検討には、Geno2Pheno法でFPR 10%未満を示しX4指向性と判定された5名から得た検体で検討した。患者の臨床情報を図3に示す。

検体ID	年齢	性別	性指向	病期	nadir CD4 ^{#1}	peak viral load ^{#2}	罹病期間
NMC191	54	男性	homo	AC	75	1.05 × 10 ⁵	不詳
NMC321	29	男性	bi	AC	179	1.11 × 10 ⁴	6年未満
NMC339	20	男性	homo	AIDS (acute)*	28	1 × 10 ⁷ 以上	3ヶ月以内
NMC434	32	男性	homo	AC	516	1.2 × 10 ⁵	不詳
NMC 471	22	男性	homo	AC	392	1.15 × 10 ⁵	3年

* 食道カンジダ症 #1 / μL, #2 copies / mL

図3 Geno2PhenoでX4と判定された症例の検討

Subtype BでG2PにてFPR 10%未満でX4と判定された5検体を実験に用いた。罹病期間は検査陰性履歴をもとに推定した。それぞれの検体のHIV-1 genome RNA、proviral DNAそれぞれから6クローンの組み替えHIV-1を作成し指向性を検討した。Homo: homosexual, bi: bisexual

(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

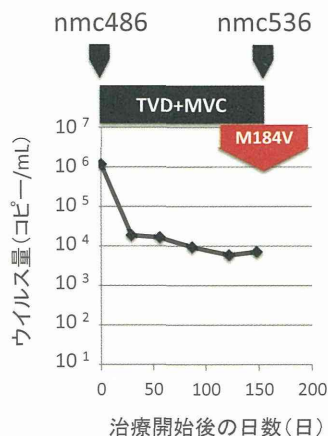
(b) 治療成功例

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

(c) 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】急性感染例



【症例2】エイズ発症例

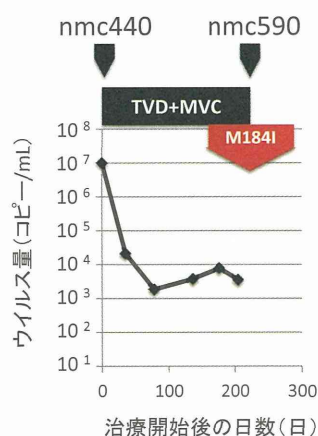


図4 MVCのみをkeyとした初回治療を行った5症例

(a) ウイルス学的治療失敗に至った2例の患者の状況、(b) 治療成功した3例の患者の状況

MVCのみをkeyとした初回治療を行った5症例の概略を示す。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。

(c) 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

治療失敗した症例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。

(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. non-subtype B HIV-1 のプロテアーゼ阻害剤感受性評価に対する virus like particle (VLP) ELISA法の有用性の検討

図5に (a) 薬剤耐性遺伝子型検査の結果、(b) VLP ELISA法を用いた表現型検査の結果を示す。遺伝子型検査の結果を見ると、母親から分離されたクローンNMC 256には耐性関連変異を認めなかったが、児は転院時のクローンNMC 271に既にV82A変異を認め、ウイルス量増加時に採取した検体NMC307ではM46I、I54Vが加わった。VLP ELISA法を用いて表現型検査を行うと、NMC 307ではLPVに対してsubtype BでLPV高度耐性が既知の320と同

等の強い耐性を示し、遺伝子型によるGSSと乖離を示した。一方、DRVは感受性であった。これらの解析をもとに母子ともにDRVをkey drugとする抗HIV療法を行ったところ良好な経過を得た。

2. MVC適応症例決定に対するMNC法の有用性の検討

血漿中のHIV-1 genome RNAおよびPBMCから抽出したprovirus DNAを鋳型にenv領域を増幅し、60クローンの組換えHIV-1を作製した。env全長の塩基配列を解析したところ、premature stop codonがあったものは1クローンのみであった。分離したクローンのFPRは0.1から4.8を示し、direct sequenceの結果に基づくFPRとほぼ一致していた。premature stop codonを有さない59クローンを用いてNMC法による表現型検査を行うと、50クローンで感染性を認めた。検体別では、NMC339、NMC434がR5、その他3症例はR5/X4と判定された。また、クローン別では指

(a) 遺伝子型検査

HXB2	PQVTLWQRPLVTIKIGGGQKLEALLDTGADDTVLEEMSLPGRWPKRMIGGGIGGFIVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF
320	--I-----I---VA-----D-----I-----V-----P-----VLS--I---T--V---M--L-----
pIndieC1	--I-----S-R-Q-----VNL--K-----P-----K-----I-----M--L-----
NMC256	--I-----S-K-A-----LK-PG-----EEVPL-----M--L-----
NMC271	--I-----S-K-A-----LK-PG-----EEVP-----A-----M--L-----
NMC307	--I-----F-S-K-A-----LK-PG-----I-----V-----EEVP-----A-----M--L-----

(b) 感受性検査

Clones	subtype	LPV		DRV		Major Resistance Mutations	Minor Resistance Mutations
		VLP*	GSS	VLP*	GSS		
HXB2	B	24.2	0	3.7	0	-	-
320	B	1611.2	65	19.0	2	M46L, I54V, V82T, L10I, L63P, A71V, G73S, L90M	V77I, I85V, I93L
NMC256	C	19.6	0	3.8	0	None	None
NMC271	C	86.0	25	2.6	0	V82A	None
NMC307	C	1658.6	51	8.1	2	M46I, I54V, V82A	L10F

図5 薬剤耐性検査の結果

遺伝子型検査の結果を(a)、感受性検査の結果を(b)に示す。HXB2のIC₅₀に対する各クローンのIC₅₀の比をVLP ELISA法の結果として示す。* GSS : Genotypic susceptibility score

指向性	R5	R5 / X4	X4
クローン数(症例数)	36 (4)	14 (2)	0

図6 Geno2PhenoでX4と判定された症例のMNC法による表現型検査

Geno2PhenoでFPR 10%未満でCXCR4指向性と判定された5症例から確立した60クローンのうち、premature stop codonがあったものは1クローンをのぞく59クローンをNP-2 cell lineに感染させたところ、50クローンで感染性を認めた。thresholdをNP-2 CD4のR.luc値の10倍と設定して指向性を決定。