

2013/9013A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

H I V - 1 の薬剤・免疫耐性変異獲得機序の解明と
新規治療法を目指した基盤的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

- HIV-1の薬剤・免疫耐性変異獲得機序の解明と新規治療法を目指した基盤的研……………1
研究代表者 滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)

II. 分担研究報告書

1. 細胞性免疫・薬剤による HIV-1 変異選択とその耐性機序の解明……………5
滝口 雅文(熊本大学エイズ学研究センター センター長/教授)
2. CTL 逃避変異が薬剤感受性に与える影響の解析……………8
潟永 博之(国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長)
3. HIV の遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗 HIV 薬の開発と……………13
中和抗体逃避 HIV-1 変異株からの CCR5 阻害薬に対する耐性誘導
馬場 昌範(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)
4. 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究……………20
松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 教授)
5. 中和抵抗性の解明と中和抗体を用いた併用療法に関する基礎研究……………23
- CCR5 阻害薬耐性 HIV-1 の中和抗体に対する感受性 -
松下 修三(熊本大学エイズ学研究センター 教授)
6. HIV-1 薬剤耐性発現機序の解明と薬剤耐性に対する強力な抗 HIV 阻害剤の研究開発……………31
中田 浩智(熊本大学医学部附属病院感染免疫診療部 講師)
7. NK 細胞による HIV の認識と免疫逃避変異の認識に与える影響に関する研究……………34
前仲 勝実(北海道大学大学院薬学研究院 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………37

IV. 添付：研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)
総括研究報告書
HIV-1の薬剤・免疫耐性変異獲得機序の解明と新規治療法を目指した基盤的研究

研究代表者: 滝口 雅文(熊本大学 エイズ学研究センター センター長/教授)
研究分担者: 潟永 博之(国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長)
馬場 昌範(鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授)
松岡 雅雄(京都大学 ウイルス研究所 教授)
松下 修三(熊本大学 エイズ学研究センター 教授)
中田 浩智(熊本大学医学部附属病院感染免疫診療部 講師)
前仲 勝実(北海道大学 大学院薬学研究院 教授)

薬剤耐性ウイルスや免疫逃避変異ウイルスの蓄積が明らかになっており、薬剤治療やワクチンの開発の大きな壁になっている。これらの課題を解決するため、多剤耐性変異ウイルスに対する新たな薬剤の開発を行うと共に、薬剤治療と免疫治療を融合させる新たな治療法のための基盤的研究を行った。その結果、今年度は4種類の臨床試験への導出可能な薬剤候補を開発することが出来た。また日本人患者コホートでCTLが選択する逃避変異の候補を284種類以上明らかにでき、白人コホートと大きく違っていることを明らかにし白人と日本人では免疫逃避変異が大きく異なっていることを解明できた。またHLA-B18拘束性のCTLからの逃避変異が、新規の非核酸逆転写酵素阻害薬Rilpivirine (RPV)の主要な耐性変異であることを明らかにし、HLA-B18を持っている患者の治療方針を検討する必要性を示した。

A. 研究目的

HAARTにより、多くのHIV患者の予後は改善されてきたが、薬剤耐性変異を持った耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じており、HAART療法に抵抗する難治性HIV感染症患者の治療が大きな課題になってきている。また、免疫から逃避する変異をもったHIV-1の蓄積も明らかになっており、ワクチンや免疫治療の確立を困難にしている。これらの研究の課題を解決するため、以下のような研究を行う。

柱1: 変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

まだ明らかにされていないCTLや中和抗体の逃避変異の同定、その変異による免疫抵抗性の機序の解明を行う。さらに薬剤による耐性変異獲得機序・多剤耐性効果を明らかにする。また、免疫により獲得した変異が薬剤の効果に及ぼす効果、あるいは薬剤が選択した変異が免疫に与える効果を明らかにする。

柱2: 耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

新規プロテアーゼ阻害剤(PI)およびHIVの遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗HIV薬の候補を同定する。また、単クローン抗体と抗ウイルス薬の併用療法の可能性を明らかにする。

B. 研究方法

柱1: 変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究

日本人慢性HIV-1感染者のHLAと相関を示すHIV-1の変異を明らかにし、その変異部位を認識する特異的CTLを用いて逃避変異であることを明らかにする[滝口]。すでに知られている逃避変異に対するCTLの認識を解析し、逃避変異出現によるCTLのHIV-1増殖抑制能の変化を調べる[滝口]。またNK細胞が認識するHIV-1由来のペプチドを明らかにし、変異がNK細胞の認識に与える影響を明らかにする[前仲・滝口]。

2) 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究

ART療法で排除できないHIV感染細胞から細胞間感染によるHIVの伝搬を明らかにし、細胞間経路およびセルフリー感染経路における抗HIV薬に対する感受性の差を明らかにする[松岡]。プロテアーゼの二量体化阻害剤(PDI)sに対する耐性変異の薬剤耐性の機序を、結晶解析・質量分析学的方法を含めた多面的方法により明らかにする[中田]。

3) 免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究及び薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究

CTL が選択する逆転写酵素、プロテアーゼ、インテグラーゼ内の逃避変異に関して、逃避変異 HIV-1 を作製し、これらの変異が薬剤耐性に与える影響を明らかにする [瀧永・滝口]。その逆に、これらの蛋白内に存在する薬剤逃避変異が CTL の認識に与える影響を明らかにする [滝口]。また抗体あるいは薬剤が選択する逃避・耐性変異がそれぞれ薬剤の感受性、抗体の認識に与える影響をしらべる [松岡・馬場]。

柱2：耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

1) 耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発

新規 PI を開発するため、新規骨格を有する PDI 候補化合物のスクリーニングを進め、活性を有するものについて構造学的評価を行い、より強力な活性を有する化合物の合成をする [中田]。Tat/TAR RNA と Cyclin T1/CDK9 の複合体形成を標的として HIV の増殖を選択的に阻害する薬剤の開発を行う [馬場]。

2) 抗体と薬剤を組み合わせた治療法の開発

現在米国で臨床試験中のCCR5阻害剤である cenicriviroc (CVC) を用いて誘導した耐性ウイルス (KK₆₅₂₋₆₇) を用いて、抗体パネルで中和感受性の比較を行い、抗体と薬剤の併用療法の可能性を検討する [松下・馬場]。

(倫理面への配慮)

患者の血液を用いて行なう研究に関しては、各施設の倫理委員会の承認を受け、その規定する指針に従っておこなった。

C. 研究結果

柱1：変異獲得の機序と変異による免疫および薬剤抵抗性獲得機序の解明

1) 免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究：

HLA-A*24:02 拘束性の Gag 28 エピトープとその変異に対する3つのタイプのCTLが、Gag 逃避変異の選択に関与していることを明らかにした (J. Virol 2012)。さらに HLA-B*51:01 拘束性 CTL により選択される RT135 の変異が、同じエピトープを認識する B*52:01 拘束性 CTL により選択されることを示した (J. Virol 2013) [滝口]。

430 人の HIV-1 感染日本人の Gag, Pol, Nef 遺伝子を解析し HLA と相関する 284 種類の変異 (HLA-associated mutations) を同定し、Pol 領域の HLA-associated mutation と患者のウイルス量

との間に負の相関がみられ、Pol 領域の変異獲得あるいは CTL の抗ウイルス効果により、HIV の増殖が抑制されている可能性が示唆された [滝口]。さらに HLA-Cw12:02 結合 HIV ペプチドを同定し、NK レセプターの結合を明らかにした [前仲]。

2) 薬剤による変異性獲得の機序と薬剤抵抗性の研究：

蛍光蛋白を組み込んだNL4-3の感染性HIV-1を用いた評価系を樹立し、これを用いて細胞間感染に対する薬剤の抗HIV効果を検証した。その結果、調べたすべての抗HIV薬に関して、細胞間感染でその効果が減弱していた [松岡]。

3) 免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究及び薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究：

一部のガイドラインでは第一選択のキードラッグとして位置付けられている新規の非核酸逆転写酵素阻害薬 Rilpivirine (RPV) の主要な耐性変異である RT の 138 番目の E が K へ置換する変異 (E138K) が、未治療の患者にも見つかることが報告されている。一方、RT138 番の近傍の部位は、HLA-B*18 拘束性 CTL のエピトープになっており、138 番の変異が免疫逃避変異になっている可能性がある。そこで未治療の感染者 1107 人の HLA と 138 番のアミノ酸を調べたところ、HLA-B*18 (-) の感染者では 0.4%しかこの変異が見つからないが、HLA-B*18 (+) の感染者では 21%に変異が見つかった ($p=4.9 \times 10^{-25}$)。また未治療患者に認められた変異 (E138G, E138A, E138K) のいずれもが、HLA-B*18 拘束性 CTL の逃避変異であることを確認した。これらの逃避変異が、それぞれ RPV 耐性をもたらすことを確認し、免疫により選択される変異が薬剤治療に影響を与えることを明らかにした (Clin. Infect. Dis. 2013) [瀧永・滝口]。

2種類のPIとIntegrase inhibitor 耐性変異が、CTLの認識を障害することを明らかにした [滝口・瀧永]。

柱2：耐性ウイルスに対する新たな治療法・予防法を開発するための基盤的研究

1) 耐性ウイルスに対する新規薬剤の開発：

Oxatricyclic構造を有する新規PI, GRL-0519を開発した。同化合物は高度多剤耐性株に対しても非常に強力な抗HIV活性を発揮し、試験管内耐性誘導ではHIV-1の耐性獲得は著しく遅延することを明らかにした。構造解析では、GRL-0519の2つのTHF構造がHIV-1プロテアーゼ (PR) 活性中心部位のアミノ酸主鎖と強固に結合する事に加え、3つ目のTHF環がPRの主要アミノ酸群と複数の相互作用を

有する事を明らかにし、その強力な抗HIV活性の機序を明らかにした。更に複数の高度多剤耐性臨床分離株に対して抗ウイルス活性が完全に維持される新規PIであるGRL-0739とtricycle構造を有する強力な新規PI、GRL-0739を同定した [中田・天野]。

Tat/TAR RNAとcyclin T1/CDK9の相互作用を標的とする新規薬剤の同定のため、in silicoスクリーニングを用いて選び出した候補化合物について、in vitro抗HIV-1活性試験を行ったところ、強い抗HIV-1活性を有するリード化合物を得ることに成功した。そのうち1つの化合物 (C3) がHIV-1 Tatによって誘導される遺伝子発現を強力に抑制すること、また宿主細胞のRNA polymerase IIのリン酸化を抑制すること、さらにTatとcyclin T1の相互作用を阻害することを明らかにした [馬場]。

2) 免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発：

CVC に対する耐性株、KK₆₅₂₋₆₇ では明らかな中和感受性の増強が、3 種類の特異性の抗体、すなわち抗 V3 抗体 (1C10, 5G2, KD-247)、CD4 結合部位に対する抗体 (CD4bs; 49G2, VRC01)、CD4 induced epitope に対する抗体 (CD4i; 4E9C) で観察された。KK₆₅₂₋₆₇ を 1C10 の選択圧のもとに培養すると、抗体に対するエスケープ変異株は、新たな変異を獲得し CVC 感受性となった。これらから、CVC 耐性と中和抗体抵抗性は両立できない可能性が考えられた。これらの結果は、CCR5 阻害薬 CVC と中和抗体との併用療法の可能性を示した [松下・馬場]。

D. 考察

免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究では、HLA-B*18 拘束性 CTL の逃避変異である RT138 の変異が、RPV に耐性をもたらしていることを明らかにした。このことは、HLA-B*18 を持った患者では、治療しなくても RT138 の変異を獲得して RPV に対して抵抗性を示す可能性があるため、RPV による治療を再検討する必要がある。今後 RPV の治療のガイドラインに、HLA-B*18 を対象としないことを入れる必要があると考えられる。

薬剤の開発の研究では、GRL-09510、GRL-0739、GRL-0519 を開発できた。GRL-0519 は分子構造上での HIV 活性阻害機構を明らかにできたが、さらに今後 GRL-0739 と GRL-09510 の HIV 活性阻害機構を明らかにしていく予定である。

日本人感染者のコホートで、CTL による選択された可能性のある変異を 284 種類同定することができた。今後このうち CTL の逃避変異として報告されていない変異に関して、CTL からの逃避変異かを明らかにし更にその変異が及ぼす機能 (ウイ

ルス増殖能、CTL 認識) を明らかにしていく。

E. 自己評価

1) 達成度について

柱1では、日本人感染者のコホートで、CTL による選択された可能性のある変異 (HLA-associated mutations) を 284 種類同定し、日本における細胞性免疫が獲得する変異の全体像を明らかにできた。さらに HIV 進化が白人や黒人と違うことを初めて明らかにした。また HLA-B*18 拘束性 CTL の逃避変異である 138 番の変異が、RPV に耐性をもたらしていることを明らかにした。免疫による変異の獲得が、抗 HIV 薬に対する耐性を生じさせる機序を世界で初めて明らかにした。このように、極めてインパクトが高い成果を出すことができた。

柱2では、高度多剤耐性株に対して非常に強力な抗 HIV 活性を発揮する 3 つの新規 PI の開発ができ、さらに Tat/TAR RNA と cyclin T1/CDK9 の相互作用を標的とする新規薬剤の同定が 1 種類でき、大きな進展が見られた。また CCR5 阻害剤 CVC と中和抗体を組み合わせた併用療法の可能性を示す成果が得られた。

以上のように 2 年間で予想を上回る成果が得られた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

免疫逃避変異が抗 HIV 薬の耐性となることを世界で初めて明らかにでき、284 種類の HLA-associated mutations を同定し、HIV の進化が白人や黒人と違うことを初めて明らかにした。また薬剤開発では、4 種類の薬剤の候補を同定し、今後の臨床試験への導出の可能性が出てきた。これらの成果は、国際的に来ても学術的にも、エイズの治療という社会的意義においても、極めて高いものである。

3) 今後の展望について

既に予想以上の成果をあげており、3 年目は具体的成果がさらに出せる課題も多く、目的の達成は可能である。

F. 結論

日本における細胞性免疫が獲得する変異の全体像を明らかにし、CTL により獲得した変異が抗 HIV 薬に対する耐性を生じさせる機序を世界で初めて明らかにした。4 種類の臨床試験への導出可能な薬剤候補を開発し、CCR5 阻害薬 CVC と中和抗体との併用療法の可能性を示す成果を得られた。

G. 健康危険情報

特筆なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

滝口 雅文

1. Ladell K*, Hashimoto M*, Iglesias MC*, Wilmann PG*, McLaren JE, Gras S, Chikata T, Kuse N, Fastenackels S, Gostick E, Bridgeman JS, Venturi V, Arkoub ZA, Agut H, van Bockel DJ, Almeida JR, Douek DC, Meyer L, Venet A, Takiguchi M*, Rossjohn J*, Price DA** and Appay V* (* **Equal contribution). A molecular basis for the control of pre-immune escape variants by HIV-specific CD8⁺ T-cells. *Immunity* 38:425-436, 2013
2. Yagita Y, Kuse N, Kuroki K, Gatanaga H, Carlson J.M, Chikata T, Brumme Z.L., Murakoshi H, Akahoshi T, Pfeifer N, Mallal S, John M, Ose T, Matsubara H, Kanda R, Fukunaga Y, Honda K, Kawashima Y, Ariumi Y, Oka S, Maenaka K, Takiguchi M. (*Equal contribution). Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity. *J Virol.* 87:2253-2263, 2013
3. Kløverpris HN, Payne RP, Sacha JB, Rasaiyaah JT, Chen F, Takiguchi M, Yang OO, Towers GJ, Goulder P, and Prado JG. Early antigen presentation of protective HIV-1 KF11_{Gag} and KK10_{Gag} epitopes from incoming viral particles facilitates rapid recognition of infected cells by specific CD8⁺ T cells, *J Virol.* 87: 2628-2638, 2013
4. Chikata T, Carlson JM, Tamura Y, Borghan MA, Naruto T, Hashimoto M, Murakoshi H, Le, AQ, Mall S, John M, Gatanaga H, Oka S, Brumme ZL, Takiguchi M, Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population, *J Virol.* 88: 4764-4775, 2014

潟永博之

1. Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Chikata T, Ode H, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S. Naturally selected rilpivirine-resistant HIV-1 variants by host cellular immunity. *Clin Infect Dis* 2013;57(7):1051-5

馬場昌範

1. Okamoto M, Chono H, Kawano Y, Saito N, Tsuda H, Inoue K, Kato I, Mineno J, Baba M. Sustained inhibition of HIV-1 replication by conditional expression of the *E. coli*-derived endoribonuclease MazF in CD4⁺ T cells. *Hum. Gene. Ther. Methods* 24: 94-103, 2013.
2. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by in silico screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 1323-1331, 2013

松岡雅雄

1. Mizuhara T, Kato T, Hirai A, Kurihara H, Shimada Y, Taniguchi M, Maeta H, Togami H, Shimura K, Matsuoka M, Okazaki S, Takeuchi T, Ohno H, Oishi S, and Fujii N. Structure-activity relationship study of phenylpyrazole derivatives as a novel class of anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23:4557-4561, 2013
2. Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa R, Miyazawa T, and Matsuoka M. Comprehensive in vitro analysis of simian retrovirus type 4 susceptibility to antiretroviral agents. *J. Virol.* 87:4322-4329, 2013

松下修三

1. Harada S., Yoshimura K., Yamaguchi A., Yusa K. & Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. *J. Gen. Virol.* 94:933-94, 2013.

中田浩智

1. Maeda K, Desai D, Aoki M, Nakata H, Kodama E, Mitsuya H. 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, *Antivir Ther.* 19(2): 179-89, 2014
2. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Nakata H, Maeda K, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H. 4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine, an HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 ex vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium, *Journal of Investigative Dermatology*, 134(4):1158-61, 2014

前仲勝実

1. Furukawa A, Kamishikiryo J, Mori D, Toyonaga K, Okabe Y, Toji A, Kanda R, Miyake Y, Ose T, Yamasaki S, Maenaka K. Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(43): 17438-43, 2013

2. 学会発表
各分担報告書に記載。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当無し。

Ⅱ. 分担研究報告書

細胞性免疫・薬剤による HIV-1 変異選択とその耐性機序の解明

研究分担者 滝口 雅文 （熊本大学エイズ学研究センター 教授）

研究協力者 久世 望 （熊本大学エイズ学研究センター 研究員）

研究要旨 日本人において CTL から逃避するウイルス変異を網羅的に解析するため、430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者を用いた HLA associated polymorphism (HLA-AP) の解析を行い、284 個の HLA-AP を明らかにした。白人中心の IHAC コホートと HLA-AP を比較した所、188 個 (66.2%) の HLA-AP が IHAC では同定されなかった。薬剤耐性変異が CTL の認識に与える影響の解析では、Protease 阻害剤変異 (Pro 82) が HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL の認識を、Integrase 阻害剤耐性変異 (Int 92) が、HLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTL の認識を低下させた。薬剤治療の失敗により蓄積される薬剤耐性変異の蓄積は、HIV-1 の病原性の増大に繋がると考えられる。

A. 研究目的

最近の我々の研究により、いくつかの強い HIV 増殖抑制能をもった CTL からの逃避するウイルスの蓄積が世界的レベルで明らかになった。そこで日本人において CTL から逃避するウイルス変異を網羅的に解析するために、日本人 HIV 感染者の HIV-1 のシーケンス解析を行い、HLA アリールと相関する HIV-1 の変異を解析する。これらのうちから実際 CTL からの逃避変異になっているものを明らかにする。また、知られた薬剤耐性変異が CTL の認識にどのような影響をうけるかを解析し、薬剤により誘導された耐性変異がどの程度感染者の HIV-1 特異的 CTL の免疫能に影響を与えるかを明らかにする。

B. 研究方法

1. HLA associated polymorphism (HLA-AP) の解析

2008 年から 2011 年までにリクルートした 430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者の Gag, Nef, Pol 領域のシーケンスを解析、また HLA class I のアリールを解析した。これらのデータから、それぞれの HLA アリールに相関する変異 (HLA-AP) を phylogenetically corrected logistic regression model (PhyloD) を用いて、解析し明らかにする。さらに白人が中心のコホート (IHAC) との HLA-AP の比較解析を行った。

2. 薬剤耐性変異が CTL の認識に与える影響の解析

報告されている CTL のエピトープ上にある薬剤耐性変異を持った変異エピトープペプチドを作成し、このペプチドに対する CTL の認識を調べる。また、変異を持った HIV-1 ウイルスを作製して、これらの変異

ウイルス感染細胞に対する CTL の認識を調べる。

(倫理面への配慮)

患者の血液の使用については、インフォームドコンセントをおこない書面にて承諾を得た。さらに、国立国際医療センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

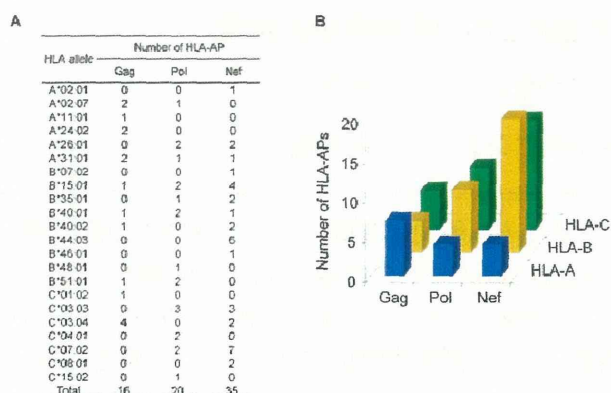
C. 研究結果

1. HLA associated polymorphism (HLA-AP) の解析

昨年度我々は、430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者の Gag, Pol, Nef 領域のシーケンスを解析した結果、284 個の HLA-AP を明らかにし、さらに HLA-AP の数と患者のウイルス量 (VL) と CD4 との相関を解析した結果それぞれの患者が持っている Pol における変異数と VL に有意な逆相関がみられることを明らかにした。さらに HLA-B*52:01 に相関した HLA-AP が VL と逆相関を示すことを明らかにした。今年度は、本コホートで同定された HLA-AP が白人中心の IHAC コホート (clade B 感染集団) でも同定されているかを調べた結果、188 個 (66.2%) の HLA-AP が IHAC では同定されなかった。

さらに共通して分布する HLA 型に絞って、phylogenetically-corrected interaction test によって比較解析をした結果、71 個の HLA-AP が両コホート間で選択される強さに明確な差があることが明らかとなった (図 1)。

図1 日本人と白人のコホート間で明確な差が見られた共通して分布するHLAに関連したHLA-AP

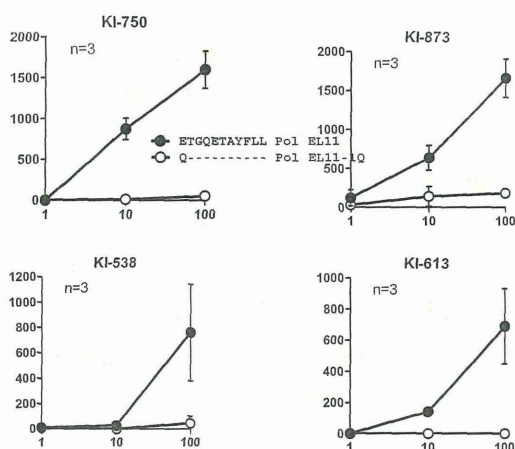


2. 薬剤耐性変異がCTLの認識に与える影響の解析

1つの Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)、1つの Protease 阻害剤変異(Pro 82)、CTLの認識に及ぼす変異を解析した。

Int92 は、HLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTL エピトープの1番目のアミノ酸がEからQへの変異であり、この変異エピトープペプチドに対する認識を調べたところ、約10倍のペプチド濃度での認識の低下がみられた。この1Q変異を持った変異ウイルスを作製し、感染細胞へのCTLの認識を調べたところ、wild-type ウイルス感染細胞と比べて変異ウイルス感染細胞に対する認識が有意に低下していた。さらに4名のHLA-B*40:02陽性のHIV-1感染者の末梢血リンパ球を用いてエリスポットアッセイで、変異エピトープペプチドに対する認識調べたところ、4名とも変異ペプチドに反応するCTLは見られなかった。これらのことから、この Integrase 阻害剤耐性変異はCTLの認識を阻害することが明らかになった(図2)。

図2 HLA-B*40:02陽性のHIV-1感染者CTLのInt92変異の認識



次に Pro82 の変異に関して調べた。この場所は、HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTL エピトープの8番目の部位に当たり、Protease 阻害剤に対する3種類のアミノ酸の耐性変異が知られている。この3種類の変異エピトープペプチドに対するHLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTLの認識を調べたところ、2つの変異(8T,8S)に対しては明らかな認識の低下がみられた。

D. 考察

430人の無治療、HIV-1慢性感染者を用いたHLA associated polymorphism (HLA-AP)の解析では、初めてアジア人で網羅的にHLA-APを明らかにすることができた。明らかにした284個のHLA-APの多くは、CTLからの逃避変異として報告されおらず、またその部位が相関を示したHLAに拘束するエピトープとしても報告されていず、このことから多くの未知のエピトープが多く存在することが予想される。今後これらのデータを利用して、逃避変異を網羅的に明らかにしていく予定である。

白人コホートとの比較研究により、予想以上に日本人と白人との間でHLA-APの相違が大きいことが明らかとなり、HLA class I型の多様性の違いによる特異的進化以外にHLA型以外の何らかの因子がHIV-1の進化に関与している可能性を示した。

Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)とProtease 阻害剤変異(Pro 82)に関してHLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTLとHLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTLの認識に与える影響を調べたが、いずれの変異もCTLの認識を低下させることが明らかになった。

E. 結論

1. 430人の無治療、HIV-1慢性感染者で明らかにした284個のHLA associated polymorphism (HLA-AP)を白人のHIV-1clade B感染集団でのHLA-APと比較解析をしたところ、34%しか一致していなかった。r両コホートに共通して存在するHLAのAPを比較解析した所、71個のHLA-APで選択される強さに有意な差が見られた。

2. Protease 阻害剤変異(Pro 82)が、HLA-A*0201 拘束性 Pol131-140 特異的 CTLの認識を、Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)が、HLA-B*40:02 拘束性 Pol 807-817 特異的 CTLの認識を低下させた。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yuichi Yagita, Nozomi Kuse, Kimiko Kuroki*, Hiroyuki Gatanaga, Jonathan M. Carlson, Takayuki Chikata, Zabrina L. Brumme, Hayato Murakoshi, Tomohiro Akahoshi, Nico Pfeifer, Simon Mallal, Mina John, Toyoyuki Ose, Haruki Matsubara, Ryo Kanda, Yuko Fukunaga, Kazutaka Honda, Yuka Kawashima, Yasuo Ariumi, Shinichi Oka, Katsumi Maenaka, and **Masafumi Takiguchi**, Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by CTLs with Identical Epitope Specificity, **J. Virol.** 87:2253-2263, 2013

2) Ladell K*, Hashimoto M*, Iglesias MC*, Wilmann PG*, McLaren JE, Gras S, Chikata T, Kuse N, Fastenackels S, Gostick E, Bridgeman JS, Venturi V, Arkoub ZA, Agut H, van Bockel DJ, Almeida JR, Douek DC, Meyer L, Venet A, **Takiguchi M****, Rossjohn J**, Price DA** and Appay V** (* **Equal contribution). A molecular basis for the control of pre-immune escape variants by HIV-specific CD8⁺ T-cells. **Immunity** 8:425-436, 2013

3) Takayuki Chikata, Jonathan M. Carlson, Yoshiko Tamura, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Anh Q. Le, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme, and **Masafumi Takiguchi**, Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population, **J.Virol.** 88: 4764-4775, 2014

4) Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, **Masafumi Takiguchi**, Raltegravir and elvitegravir-resistance mutation E92Q affects HLA-B*40:02-restricted HIV-1-specific CTL recognition. **Microbes and Infection** In press

2. 国際学会での発表

1) Nozomi Kuse, Tomohiro Akahoshi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and **Masafumi Takiguchi**, Selection of Pol283-8V Mutant by Pol283-8-specific CTLs in

HLA-B*51:01+Long-Term Non Progressors, AIDS Vaccine 2013 (Barcelona, Spain) October 7-10, 2013

2) Takayuki Chikata, Jonathan M Carlson, Yoshiko Tamura, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme and **Masafumi Takiguchi**, HIV-1 polymorphisms associated with 4-digit HLA alleles in Japanese individuals chronically infected with the clade B virus, AIDS Vaccine 2013 (Barcelona, Spain) October 7-10, 2013

3) Tomohiro Akahoshi, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Shinichi Oka and **Masafumi Takiguchi**, Reversion of a CTL escape mutation by escape mutant-specific CTLs, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

4) Takayuki Chikata, Jonathan M Carlson, Yoshiko Tamura, Mohamed Ali Borghan, Takuya Naruto, Masao Hashimoto, Hayato Murakoshi, Simon Mallal, Mina John, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, Zabrina L. Brumme and **Masafumi Takiguchi**, Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

5) Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and **Masafumi Takiguchi**, Effect of protease inhibitor- and integrase inhibitor-resistant mutations on HIV-1-specific CTL recognition, 14th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 29-31, 2013

6) Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Madoka Koyanagi, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka and **Masafumi Takiguchi**, Effect of protease inhibitor- and integrase inhibitor-resistant mutations on HIV-1-specific CTL recognition, Keystone Symposia: X3, HIV Vaccines: Adaptive Immunity and Beyond (Banff, Canada), March 9-14, 2014

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

研究分担者：瀧永 博之（独）国立国際医療研究センター

エイズ治療・研究開発センター 治療開発室医長

研究要旨 新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine が本邦でも臨床導入されたが、その耐性変異である逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸の変異が、低頻度ではあるが未治療感染者でも認められることが報告されている。国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターを受診した未治療感染者 1107 人の HIV-1 逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸を調べたところ、1099 人 (99.28%) で野生型である E であったが、他に E138G が 3 人 (0.27%)、E138A が 3 人 (0.27%)、E138K が 2 人 (0.18%) に見られた。これらの E138G/A/K の変異は HLA-B*18 陽性感染者に多く見られ (21.05%)、HLA-B*18 陰性者には少なかった (0.37%) ($p=4.9 \times 10^{-25}$)。HLA-B*18 陽性感染者から CD8 陽性細胞を分離し、138 番のアミノ酸を含む HLA-B*18 拘束性細胞傷害性リンパ球 (CTL) の epitope peptide に対する反応を調べたところ、wild-type peptide には反応が見られたが、E138G/A/K のいずれの mutant peptide に対しても反応が認められなかった。組み替え HIV-1 を作成してこれらの変異の rilpivirine 感受性への影響を調べたところ、E138G が 5.1 倍、E138A が 7.1 倍、E138K が 2.7 倍の耐性を付与していた。HLA-B*18 拘束性 CTL が rilpivirine 耐性変異を誘導していることが示された。

A. 研究目的

HIV-1 は、HLA 拘束性 CTL から逃避する変異を獲得し、CTL の選択圧の下でも増殖し得る。CTL 逃避変異が viral fitness をあまり落とさない場合、その逃避変異は、当該 HLA を持たない宿主に伝播した後も存続し続け、集団内の HLA に適応して拡がっていくことが知られている。現在の抗 HIV-1 薬の多くが Pol 蛋白をそのターゲットとしており、また近年、HIV-1 Pol 領域に存在する CTL エピトープが次々と明らかになっており、CTL 逃避変異の薬剤感受性に与える影響が注目を浴びてきている。また、平成 24 年から新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine が本邦でも臨床導入され、その有害事象の少なさから投与症例数が増しているが、同じ非核酸系逆転写酵素阻害薬である efavirenz よりもウイルス学的な治療失敗に伴う耐性変異の出現頻度が多いことが臨床試験で明らかにされており、注意を要するところである。また、頻度は低い但未治療感染者の HIV-1 に rilpivirine 耐性変異が同定されることも多いため、このメカニズムを明らかにすることを研究目的とした。

B. 研究方法

臨床試験において rilpivirine 治療失敗例には、HIV-1 逆転写酵素領域に E138K が共通して出現することが明らかになっているため、未治療感染者に見られる E138 の variation の頻度、感染者の HLA との関連、その非核酸系逆転写酵素阻害薬感受性への影響、について解析した。関連する HLA の拘束性 CTL への影響を調べるため、野生型および E138 変異型のエピトープペプチドで当該 HLA 陽性の感染者の CD8 陽性リンパ球を刺激し、IFN γ の再生を調べた。

（倫理面の配慮）

国立国際医療研究センターの患者の HLA と HIV-1 シークエンスを解析することとなるため、国立国際医療研究センターの倫理委員会において承認を得た。患者の理解と協力を得るため、研究の必要性和意義について十分に説明し、それぞれの施設の倫理規定に従い同意書に自筆のサインを得た。サインされた同意文書はカルテに綴じ込み保存している。また、研究への参加の同意・不同意に関わらず、診療上の不利益は被らないように

配慮した。個人情報保護のため、個人を特定できるような情報は外部には出さないこととした。

C. 研究結果

未治療感染者 1107 人の HIV-1 逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸を調べたところ、1099 人 (99.28%) で E であったが、E138G が 3 人 (0.27%)、E138A が 3 人 (0.27%)、E138K が 2 人 (0.18%) に見られた (表 1)。138 番目のアミノ酸の付近は、HLA-B*18 拘束性 CTL のエピトープが存在する可能性が過去の報告から示唆されていたため、HLA-B*18 の有無で感染者を分類し、138 番目のアミノ酸を比較した。HLA-B*18 は日本人には見られない HLA であり、事実、19 人が HLA-B*18 陽性であったが、全員外国人であった。E138G/A/K は、HLA-B*18 陽性感染者 19 人のうちの 4 人 (21.05%) に認められ、HLA-B*18 陰性感染者 1088 人のうちの 4 人 (0.37%) に認められた。極めて強い有意差 ($p=4.9 \times 10^{-25}$) をもって、HLA-B*18 陽性者に多く E138G/A/K が認められており、この変異が HLA-B*18 拘束性 CTL からの逃避変異であることが示唆された。

138 番のアミノ酸を含む様々なペプチドで HLA-B*18 陽性感染者の CD8 陽性リンパ球を刺激したところ、NETPGIRY (NY8) というペプチドで最も強い反応が見られ、HLA-B*18 拘束性 CTL のエピトープであることが示された。次にこのペプチドの 138 番目のアミノ酸の相応する 2 番目のアミノ酸の E を G, A, K に変えたペプチド NY8-2G, NY8-2A, NY8-2K を作成し、先と同様に HLA-B*18 陽性者の CD8 陽性リンパ球に反応させたところ、いずれのペプチドに対しても反応は見られないか著しく減弱した (図 1)。これらの解析から、E138G/A/K は HLA-B*18 拘束性 CTL からの逃避変異であることが明らかとなった。

これらの変異を持つ組み替え HIV-1 を作成して、rilpivirine 感受性を調べたところ、E138G が 5.1 倍、E138A が 7.1 倍、E138K が 2.7 倍の耐性を付与していた (表 2)。コンピューターによる構造解析でも、wild-type である E138 の側鎖は、K101 と salt bridge を形成し、安定した rilpivirine との結合を可能にするが、E138G や E138A に置換すると salt bridge が形成されず、rilpivirine との間に gap が生じ、結合を脆弱なものにするため、rilpivirine への感受性を減弱することが示唆された。

D. 考察

感染者の免疫能が薬剤耐性変異を誘導してしまうという極めて興味深い例を発見した。HLA-B*18 陽性感染者に rilpivirine を投与する場合には、事前に薬剤耐性変異が存在しないことを確認することが必須である。

E. 結論

HLA-B*18 拘束性 CTL のエピトープが、rilpivirine 耐性変異の起こる逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸を含んでおり、rilpivirine 耐性変異である E138G、E138A、E138K が、HLA-B*18 拘束性 CTL からの逃避変異になっていることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gatanaga H, Murakoshi H, Hachiya A, Hayashida T, Chikata T, Ode H, Tsuchiya K, Sugiura W, Takiguchi M, Oka S. Naturally selected rilpivirine-resistant HIV-1 variants by host cellular immunity. *Clinical Infectious Diseases* 2013 Vol. 57 1051-1055.

2. 学会発表

- 1) 瀧永博之. 症例から考える HIV 感染症/AIDS 診療抗 HIV 療法に失敗した場合の対処 第 87 回日本感染症学会学術講演会 2013 年 6 月 横浜
- 2) 青木孝弘、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 低用量 ST 合剤による HIV 関連ニューモシスチス肺炎の治療の後視的検討 第 87 回日本感染症学会学術講演会 2013 年 6 月 横浜
- 3) 塚田訓久、瀧永博之、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおける Rilpivirine の使用成績 第 87 回日本感染症学会学術講演会 2013 年 6 月 横浜
- 4) 青木孝弘、水島大輔、西島健、木内英、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 潜在性結核へ治療を適用した HIV 感染者の検討 第 87 回日本感染症学会学術講演

- 会 2013年6月 横浜
- 5) 瀧永博之. 「HIV感染症とAging」長期合併症予防を考慮したARTの選択 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 6) 瀧永博之. 「日本の臨床試験は必要か ～エジュラントを例に考察する～」国内の多施設共同臨床研究と予期せぬ副作用症例 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 7) 山元佳、上村悠、的野多加志、柳川泰昭、石金正裕、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. CD4数200/ μ L以上にも関わらずエイズ発症に至った20症例における検討 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 8) 上村悠、石金正裕、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV患者のMycobacterium kansasiiの共感染の一例 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 9) 木内英、叶谷文彦、水島大輔、西島健、渡辺恒二、青木孝弘、矢崎博久、本田元人、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV感染者における骨密度、およびその低下要因 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 10) 西島健、瀧永博之、遠藤知之、堀場昌英、古賀道子、内藤俊夫、伊戸田一郎、鄭真徳、藤井輝久、高田清式、山本政弘、宮川寿一、田邊嘉也、満屋裕明、岡慎一. テノホビル/エムトリシタビン・ロピナビル/リトナビル内服例を現行レジメンとラルテグラビル・ダルナビル/リトナビルに無作為割付する多施設共同臨床試験 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 11) 近田貴敬、Jonathan M. Carlson、田村美子、Mohamed Ali Borghan、成戸卓也、端本昌夫、村越勇人、Simon Mallal、Mina John、瀧永博之、岡慎一、Zabrina L. Brumme、滝口雅文. 日本人と白人におけるHIV-1サブタイプBのHLA-Associated Polymorphismの比較 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 12) 水島大輔、田沼順子、叶谷文彦、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. ハノイのHIV感染者におけるテノフォビル使用による腎機能障害に対する影響 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 13) 本田元人、上村悠、杉原淳、柳川泰昭、的野多加志、石金正裕、山元佳、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. CD4数200/ μ L以上にも関わらずエイズ発症に至った20症例における検討 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 14) 青木孝弘、石金正裕、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV合播種性MAC症における血清学的診断の後視的検討 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 15) 大金美和、池田和子、塩田ひとみ、中家奈緒美、木下真理、小山美紀、伊藤紅、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV感染血友病患者の包括的視点による支援特性のパイロット調査 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 16) 池田和子、西城淳美、服部久恵、大金美和、塩田ひとみ、伊藤紅、小山美紀、木下真理、中家奈緒美、照屋勝治、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV感染症患者の長期療養支援の検討～薬害被害者の入院と連携状況について～ 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 17) 木下真理、池田和子、塩田ひとみ、小山美紀、伊藤紅、杉野祐子、大金美和、塚田訓久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. (独)国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターにおける外国人患者の療養状況 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 18) 塚田訓久、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 当センターにおける初回抗HIV療法の動向 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 19) 西島健、照屋勝治、塚田訓久、杉原淳、柳川泰昭、的野多加志、石金正裕、山元佳、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 初回治療における1日1回投与Darunavirの治療成績：48週データ 第27回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
 - 20) 叶谷文秀、石坂美知代、瀧永博之、山本健二、岡慎一. 抗HIV療法における低毒性長期暴露時の骨副作用モニター ―当院マラビロク治療症例の場合― 第27回日本エイズ学会学術講演

- 演会 2013年11月 熊本
- 21) 大木桜子、土屋亮人、林田庸総、酒井真依、増田純一、千田昌之、瀧永博之、水野宏一、菊池嘉、和泉啓司郎、岡慎一。日本人 HIV 患者におけるダルナビル血中濃度の検討 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 22) 林田庸総、土屋亮人、瀧永博之、岡慎一。Deep sequencing を用いた X4 ウイルスの出現およびその後の進化の解析 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 23) 阪井恵子、近田貴敬、長谷川真理、瀧永博之、岡慎一、滝口雅文。無治療の日本人 HIV 感染者における Gag 依存のウイルス増殖能と病態進行性の網羅的解析 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 24) 椎野禎一郎、服部純子、瀧永博之、吉田繁、石ヶ坪良明、近藤真規子、貞升健志、横幕能行、古賀道子、上田幹夫、田邊嘉也、渡辺大、森治代、南留美、健山正男、杉浦互。国内感染者集団の大規模塩基配列 4 : サブタイプと感染リスクによる伝播効率の差異 第 27 回日本エイズ学会総会・学術集会 2013年11月 熊本
- 25) 渡邊愛祈、中里愛、小松賢亮、高橋卓巳、青木孝弘、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、塚田訓久、加藤温、関由賀子、今井公文、菊池嘉、岡慎一。当院の HIV 感染者における精神科受診の実態調査 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 26) 重見麗、服部純子、蜂谷敦子、瀧永博之、渡辺大、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、伊藤俊宏、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、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、高田清式、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 27 回日本エイズ学会総会・学術集会 2013年11月 熊本
- 27) 石金正裕、上村悠、杉原淳、柳川泰昭、的野多加志、山元佳、水島大輔、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。当院の HIV 感染者に合併した急性 C 型肝炎 36 例の臨床的検討 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 28) 渡辺恒二、小林泰一郎、石金正裕、水島大輔、西島健、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一、日野原千速、三原史規、矢野秀朗、村田行則、猪狩亨。HIV 感染合併虫垂炎症例におけるアメーバ性虫垂炎の頻度とその特徴 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 29) 矢崎博久、上村悠、石金正裕、的野多加志、杉原淳、柳川泰昭、山元佳、水島大輔、西島健、木内英、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、田沼順子、塚田訓久、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。HIV 感染者における Helicobacter pylori 新規感染と既感染者の治療経過と合併症について 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 30) 土屋亮人、大出裕高、林田庸総、柿澤淳子、佐藤裕徳、岡慎一、瀧永博之。Env V3 領域における 11 番目 Arg 挿入と 25 番目のアミノ酸欠失および N-結合型糖鎖修飾部位の変異は HIV-1 に CXCR4 指向性を付与する 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 31) 西島健、上村悠、杉原淳、柳川泰昭、的野多加志、石金正裕、山元佳、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、木内英、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。効果・安全性に優れた抗 HIV 療法の時代における HIV 感染者の予後検討 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013年11月 熊本
- 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。

HIV 逆転写酵素 の 138 番アミノ酸	B*18(+) n=19	B*18(-) n=1,088
E138 (wild-type)	15	1,084
E138G	2	1
E138A	1	2
E138K	1	1
E138G/A/K	4 (21.05%)	4 (0.37%)

表 1. HLA-B*18 と HIV 逆転写酵素 138 番アミノ酸

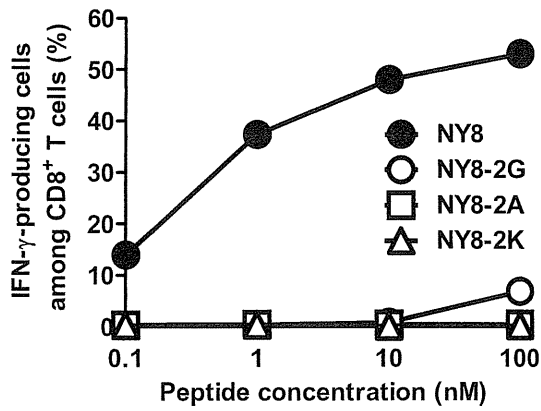


図 1. エピトープペプチドに対する HLA-B*18 拘束性 CTL 活性

HIV 逆転写酵素の 138 番アミノ酸	fold resistance
E138 (wild-type)	1
E138G	5.1
E138A	7.1
E138K	2.7

表 2. 逆転写酵素 138 番アミノ酸の rilpivirine 感受性に対する影響

HIV の遺伝子発現機構に関与する分子を標的とする新規抗 HIV 薬の開発と
中和抗体逃避 HIV-1 変異株からの CCR5 阻害薬に対する耐性誘導

研究分担者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 岡本実佳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 准教授

織田隆誠 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 大学院生

研究要旨：薬剤耐性ウイルスに対する新たな治療戦略を確立することを目的として、1) Tat/cyclin T1/TAR RNA の相互作用を標的とした新しい薬剤の同定と開発、2) 中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たなエイズ治療の可能性の探索の 2 課題について、研究を実施した。前年度までの研究において同定することに成功した、新しい HIV-1 転写阻害薬である化合物 C3 について、誘導体の構造活性相関を検討するとともに、その結果に基づいて、新規な C3 誘導体の慢性潜伏感染細胞における抗 HIV-1 効果について調べた。一方、HIV-1 に対して強い中和活性を持つ単クローン抗体 KD-247 からの逃避変異株を用いて、CCR5 阻害薬である cenicriviroc および maraviroc に対する耐性誘導を行った。現在、これらの薬剤の野生型 HIV-1 に対する 50% 有効濃度 (EC₅₀) の 64 倍の濃度でも増殖が可能なウイルスを得ている。

A. 研究目的

作用機序の異なる複数の抗 HIV-1 薬を併用する抗エイズ療法 (antiretroviral therapy; ART) の確立は、エイズ患者の予後を著しく改善した。一方で、既存の抗エイズ薬は、患者の体内からウイルスを完全に排除できないことから、患者はエイズの発症を防ぐために、生涯にわたり服薬を続けなければならない。しかしながら、HIV-1 はそのライフサイクルにおいて高頻度に変異を起こすことから、長期間にわたる治療は、薬剤耐性ウイルスの出現による薬効の減弱とそれに伴う病態の進行が危惧されている。また、ある薬剤に対して耐性を獲得した HIV-1 は、同じカテゴリーに属する他の薬剤に対しても交叉耐性を持つことが多く、この場合は使用可能な薬剤が大幅に制限される。

HIV-1 のライフサイクルにおいて、プロウイ

ルス DNA からの転写過程は、HIV-1 ゲノム RNA が増幅する唯一のステップであり、ウイルスの増殖には必須のステップの 1 つである。従って、このステップを阻害する薬剤は、強力な抗 HIV-1 になることが予想されることから、われわれの研究グループをはじめ、多くのグループが研究を続けているが、同定された薬剤はいずれも毒性が強く、未だに抗エイズ薬として認可されたものはない。

HIV-1 の転写過程は、宿主細胞因子の cyclin T1/CDK9 と HIV-1 由来の Tat タンパク質が複合体を形成し、その後、この複合体が宿主遺伝子に組み込まれた HIV-1 プロウイルス上の TAR RNA に移行し、RNA ポリメラーゼ II がリン酸化されることで開始される。そこで、われわれは、cyclin T1/CDK9/Tat/TAR RNA で構成される複合体の形成に着目し、これまでにこの複合体

の形成を阻害する低分子化合物の同定を試みてきた。約 300 万の薬剤ライブラリーに対し、*in silico* スクリーニングを実施し、選び出された数百の化合物について、慢性感染細胞である OM-10.1 細胞からの HIV-1 産生を選択的に阻害する薬剤 Compound 3 (C3) を同定することに成功した。そこで、本年度の研究では C3 の構造活性相関について検討する目的で、種々の誘導体についてそれらの抗 HIV-1 効果を検討した。

一方、本研究班内部での共同研究として、松下(熊本大学)らの中和抗体に関する研究成果と、馬場らによる CCR5 阻害薬に関する研究成果を融合させることで、中和抗体と CCR5 阻害薬の併用による、新たな抗エイズ治療の可能性を探ることを目的として、お互いが異なる実験を進めている(融合研究)。

この背景として、松下らが同定した KD-247 は、HIV-1 の gp120-V3 tip をエピトープとして認識する、ヒト化された単クローン抗体であり、subtype B の HIV-1 臨床分離株に対して強い中和活性を有することが報告されている。さらに、KD-247 に対して中和抵抗性を示すウイルス(エスケープ変異株)が、ある種の CCR5 阻害薬に対して高感受性を示すことも分かっている。一方、馬場らは武田薬品工業と共同で、世界で最初に低分子 CCR5 阻害薬 TAK-779 を発見し、これが強い抗 HIV-1 効果を持つことを報告した。その後、TAK-779 誘導体で、より効果の強い TAK-652 を同定し、TAK-652 は現在、米国の製薬企業により、*cenicriviroc* として、第 IIb 相臨床試験が終了している。また、馬場らは、*in vitro* 感染実験にて、TAK-652 に対する薬剤耐性 HIV-1 の分離に成功している。

そこで、本研究においては、KD-247 に対するエスケープ変異株が化学構造の異なる種々の CCR5 拮抗薬に対して、高感受性を示すかどうかを検証するとともに(馬場担当)、逆に CCR5 阻害薬耐性ウイルスが中和抗体に対し

て高感受性を示すかどうかを検証する(松下担当)。最終的には、これら双方の研究成果を持ち寄ることで、KD-247 と *cenicriviroc* の併用による新たな ART の確立を目指している。なお、本報告書では、馬場担当部分に関する今年度の融合研究の成果についても報告する。

B. 研究方法

ウイルス：融合研究において使用する R5 HIV-1 の実験室内継代株である Ba-L および JR-FL と、それから誘導された KD-247 に対するエスケープ変異株の Ba-L mt および JR-FL mt は、分担研究者の松下より分与された。ウイルスの増殖には当研究室で樹立した CCR5 を発現させた MOLT-4 細胞である MOLT-4/CCR5 細胞を用いた。ウイルスストックは、後述の TZM-bl 細胞を用いてタイトレーションを行い、使用するまで、 -80°C にて保存した。

細胞株：(1) 転写阻害薬の抗 HIV-1 アッセイには、HIV-1 慢性感染細胞株である OM-10.1 細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎仔血清(FBS) および抗生物質添加 RPMI 1640 メジウムを用いて継代維持した。(2) 融合研究における、ウイルスのタイトレーションおよび抗 HIV-1 アッセイには、HeLa 細胞に CCR5 を発現させ、HIV-1 LTR の下流に β -ガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた TZM-bl 細胞を用いた。細胞は 10% FBS および抗生物質添加 DMEM メジウムを用いて継代維持した。

薬剤：(1) C3 誘導体は MolPort 社(Latvia) から購入した。(2) 融合研究には 4 種類の CCR5 阻害薬、TAK-779, *cenicriviroc*, TAK-220, *maraviroc* を用いた。薬剤は *maraviroc* を除き、武田薬品工業から分与された。*Maraviroc* は Sigma-Aldrich より購入した。TAK-779 は蒸留水で、それ以外の薬剤は DMSO に 20 mM の濃度で融解し、アッセイのときまで -20°C にて保存した。

抗 HIV-1 アッセイ: (1) C3 誘導体の抗 HIV-1 効果は, TNF- α で刺激した OM-10.1 細胞からのウイルス産生を調べることにより判定した。具体的には, 種々の濃度の薬剤存在下で細胞を培養し, 24 時間後に TNF- α を培養液に加えた。さらに 72 時間培養した後, 培養上清を採取し, その中の HIV-1 p24 量を ELISA 法により測定した。また, 薬剤の細胞毒性は, 生細胞数を色素 (MTT) 法にて定量した。(2) 融合研究における中和抗体および薬剤の抗 HIV-1 効果は, 感染 TZM-bl 細胞を用いて, ウイルスの増殖を調べることにより判定した。具体的には, 細胞を 1×10^4 cells/well で 96 穴マイクロプレートに播種し, 24 時間後に 100 focus forming units/well のウイルスを感染させ, 同時に種々の濃度の薬剤を添加した。これらの細胞を培養し, 48 時間後に培養上清を除去し, PBS にて洗浄後, ウイルスの増殖の程度を β -Gal Reporter Gene Assay 試薬 (Roche) を用いて定量した。また, 中和抗体および薬剤の細胞毒性は, MTT 法に

て生細胞数を測定した。

(倫理面への配慮について)

本研究では, 実験室で使用されている細胞株およびウイルスを用いて実施しており, 個人が特定出来るようなヒトのサンプルは一切用いていない。

C. 研究結果

C3 誘導体の抗 HIV-1 効果: 昨年度までの研究で得られている C3 誘導体の構造活性相関についてまとめたものを図 1 に示す。

C3 が抗 HIV-1 効果を示すためには, pyridine 環と benzothiadiazole 骨格が必須であり, これらを他の構造に置き換えると, 活性を失うことが分かっている。そこで, 今回はこれらの構造を固定するとともに, 構造を変えることで活性に影響を与える quinolinone 部分の構造を変化させた誘導体について, それらの抗 HIV-1 効果について検討した。

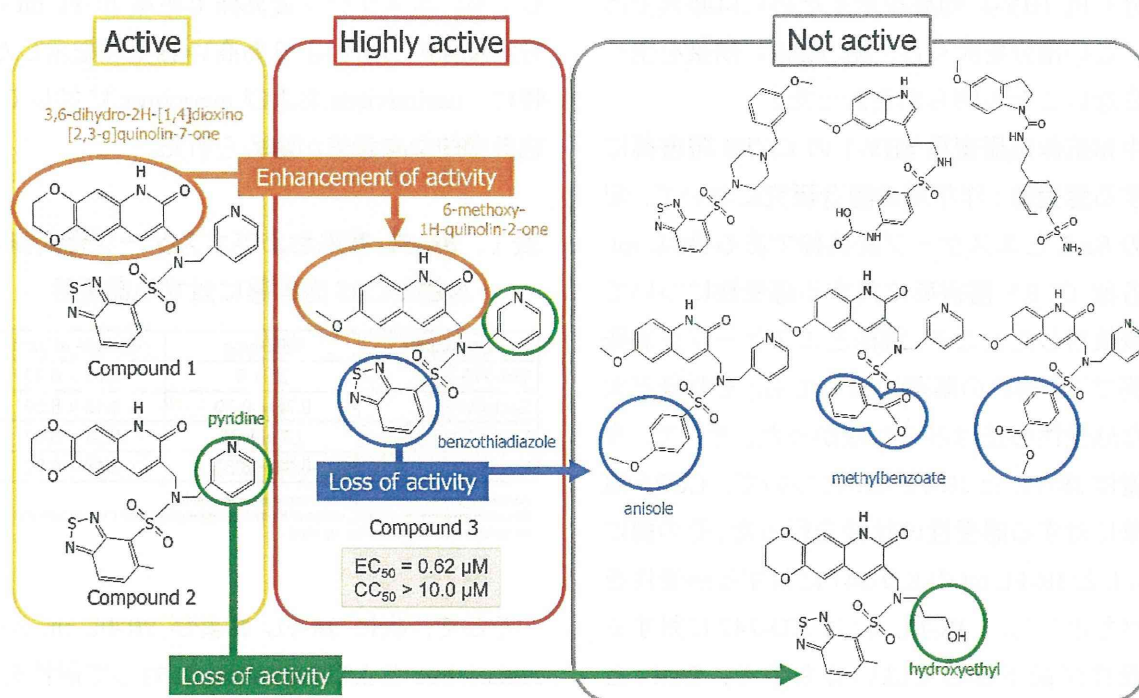


図 1. これまでの研究により得られた Compound 3 (C3) 誘導体の構造活性相関

Structure	R ₁	R ₂	EC ₅₀ (CC ₅₀)	R ₁	R ₂	EC ₅₀ (CC ₅₀)
	H	H	> 50 (> 50)	CH ₃		> 50 (> 50)
	H		> 50 (> 50)	H		42.4 (> 50)
	CH ₃		> 50 (> 50)	CH ₃		11.1 (> 50)
	CH ₃		> 50 (> 50)	CH ₃		> 50 (> 50)
	CH ₃		> 50 (> 50)	H		> 50 (> 50)

図2. 新規 C3 誘導体の OM-10.1 細胞における抗 HIV-1 効果

図2に示すように、今回アッセイを行った10種類の誘導体の中で、C3以上の活性を示すものは同定できなかった。また、quinolinone部分も抗 HIV-1 効果を示すためには必須であり、この部分を欠くと、抗 HIV-1 効果を全く示さないことも明らかとなった。

中和抗体逃避変異 HIV-1 の CCR5 阻害薬に対する感受性：昨年度の融合研究において、親株の Ba-L とエスケープ変異株である Ba-L mt. の各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について比較検討したところ、親株とエスケープ変異株の間では、何れの薬剤に対しても、それほど大きな感受性の差はみられなかった。そこで、今年度は JR-FL と JR-FL mt について、CCR5 阻害薬に対する感受性の比較を行った。その前に JR-FL と JR-FL mt の KD-247 に対する感受性を調べたところ、JR-FL mt は KD-247 に対する感受性が低下をしてはいるものの、Ba-L と Ba-L mt で見られたような差は示さないことが分かった (data not shown)。

次に、JR-FL および JR-FL mt の各種 CCR5 阻害薬に対する感受性について比較検討したところ、表1に示すように、いずれの薬剤に対しても、エスケープ変異株である JR-FL mt の方が親株の JR-FL よりも高い感受性を示した。特に、cenicriviroc および maraviroc に対しては統計学的な有意差が認められた。

表1. JR-FL 親株およびエスケープ変異株の各種 CCR5 阻害薬に対する感受性

Compound	Wild-type	Escape mutant
TAK-779	21 ± 9	0.62 ± 0.23
Cenicriviroc	0.78 ± 0.20	0.15 ± 0.09
TAK-220	1.7 ± 0.70	0.11 ± 0.02
Maraviroc	0.84 ± 0.02	0.19 ± 0.02

All data represent means ± SD for 3 separate experiments. Statistical analysis for the EC₅₀ values of the test compounds against the wild type and mutants viruses was performed by *t*-test.

そこで、次に JR-FL および JR-FL mt から cenicriviroc および maraviroc に対して耐性を示す変異株を誘導する目的で、それぞれの薬剤の50%有効濃度 (EC₅₀) の存在下にて、ウイル