

201421007A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(エイズ対策実用化研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成27(2015)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……………9
瀧永 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……………15
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……………22
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……………25
- 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……………33
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 ……………35

IV. 添付：研究成果の刊行物・別刷

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: 瀧永 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)

前仲 勝実(北海道大学 大学院薬学研究院 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)

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、薬剤療法に及ぼす免疫逃避の研究、薬剤治療と免疫治療を融合させる新たな治療法の開発、免疫療法のための基盤的研究を行った。その結果、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、特にHLA-B*52:01に相関したPol領域の変異の病態進行における重要性を明らかにした。CTLにより獲得した変異と薬剤耐性変異の相乗効果を証明できた。また4種類の臨床試験への導出可能な薬剤候補を開発し、その詳細な薬剤特性を解析した。

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]。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(PDIs)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：

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。特に Protective haplotype である HLA-B*52:01 に相関する HLA-AP の効果が大きかった。さらにこれらの HLA-AP が、HLA-B*52:01-C*12:02 haplotype のいずれかの HLA アリールに拘束するエピトープ内にあること明らかし、CTL による選択の影響が考えられた [滝口]。さらに HLA-Cw12:02 結合 HIV ペプチドを同定し、HLA-Cw12:02 の血漿構造を明らかにした [前仲]。

2) 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：

HIV-1 の逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸は、HLA-B*18 拘束性細胞傷害性 T 細胞からの逃避変異の起こる部位であり、新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine に対する耐性変異の起こる場所でもある。rilpivirine 治療失敗時に E138K 変異が最も高頻度に見られるが、この変異のみでは、2.7 倍の rilpivirine 耐性しか賦与できなかった。rilpivirine 治療に失敗した 5 症例の HIV-1 逆転写酵素シーケンスを解析したところ、3 症例に E138K が出現していた。E138K が出現した症例に共通する他の変異として 135 番目のアミノ酸変異が認められた。135 番目の変異と E138K の両方を持つ組み換え HIV-1 を作成したところ、E135T と E138K の組合せで 8.7 倍の rilpivirine 耐性、E135L と E138K の組合せで 9.5 倍の rilpivirine 耐性となった。Rilpivirine 治療失敗時に高頻度に出現する HIV-1 逆転写酵素の E138K 変異は、そのみでは高度な rilpivirine 耐性をもたらさないが、日本人に多い I135T や I135L などと共存すると高度な rilpivirine 耐性をもたらす、臨床的な治療失敗につながると考えられた。 [瀧永]。

NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, and Y181V) の 3 つの異なったエピトープを認識する CTL に与える影響を、subtype B と subtype AE 感染患者で解析した。3 つの CTL の内、2 つの subtype 間での影響は、NY9 特異的 CTL への影響のみ違いが見られ、subtype B ではこれらの変異は CTL の認識を低下させたが、subtype AE ではその効果は少なかった。 [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：

cyclohexyl-*bis*-THF という新たな構造を有し、野生株および高度多剤耐性株に対して強力な抗 HIV 活性を発揮する新規 PI, GRL-0739 を米国研究グループと共同開発、結晶構造解析を含めた同化合物の詳細な検討を行った (Amano, Mitsuya, AAC, 2015)。また特徴的な polycycle 構造を有し、複数の高度多剤耐性臨床分離株に対しても抗ウイルス活性を完全に維持している強力な新規 PI である GRL-09510 を同定し、同化合物への HIV の耐性誘導を含めた評価検討を行った [中田]。

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し、韓国のソウル国立

大学と共同で、HIV-1のTAR (trans-activation element) RNAに作用し、HIV-1の転写を阻害するペプチドの同定を行った[馬場]。

2) 免疫と薬剤を組み合わせた治療法の開発：

CVC 耐性と中和抗体感受性にかかわる変異を詳細に検討した。CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 1C10 逃避株 KK_{652-67/1C10-7} を組換えて検討した結果、V3 領域の R315K が、1C10 中和抵抗性に関連し、G324R が CVC 感受性の回復に重要であることが明らかとなった。一方、CVC 耐性株 KK₆₅₂₋₆₇ と 4E9C 抵抗性株 KK_{652-67/4E9C-11} の組換え変異体の解析では、V3 領域の G324R と C3 領域の E381K が 4E9C からの逃避と CVC 感受性回復に重要であることが判明した。これらの変異のうち、G324R は 1C10 と 4E9C の両方の逃避で観察されたことから、中和抗体からの逃避と CVC への感受性回復に重要な変異であると考えられた[松下・馬場]。

D. 考察

免疫系による変異獲得の機序と免疫抵抗性の研究では、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、特に Protective haplotype である HLA-B*52:01 に相関する HLA-AP の効果が大きかった。このことから日本人感染者では、HLA-B*52:01 拘束性 CTL による Pol 領域の変異獲得あるいは CTL の抗ウイルス効果により pVL 低下および CD4 の上昇がみられたと考えられた。免疫系が獲得する変異による薬剤抵抗性の研究では、rilpivirine に対する耐性変異 RT138 は、HLA-B*51:01 拘束性 CTL が選択する I135T や I135L などと共存すると高度な rilpivirine 耐性をもたらすことを明らかにし、2つの変異が相乗的に効果をもたらす臨床的な治療失敗につながると考えられた。薬剤耐性変異が免疫認識に与える研究では、NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, and Y181V) の3つの異なったエピトープを認識する CTL に与える影響を、subtype B と subtype AE 感染患者で解析した。これらの3つの変異は subtype B 感染では3つの CTL の認識を低下させたが、subtype AE では NY9 特異的 CTL への認識の低下は軽度かほとんどなく、その効果は少なかった。このように感染しているウイルスの種類によりその効果は異なることが明らかになって。

E. 自己評価

1) 達成度について

柱1での研究成果は以上に述べたように明らかに進展がみられ、十分に目的は達成できた。また柱2においても薬剤開発の分野での進展がみられ本研究の進展が見られた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

日本人の患者では、POL領域の免疫逃避変異の蓄積が病態進行に逆比例することを示したが、これは今まで報告があった白人やアフリカ人で見られたGag領域の蓄積が重要であることと異なっており、日本人で免疫逃避の蓄積効果が白人・アフリカ人と異なっていることを示した初めての例であり、学術的にも極めて価値が高い成果である。またrilpivirineに対する耐性変異RT138の研究では、免疫逃避変異RT135との相乗効果により薬剤耐性力が高まっていることを明らかにでき、今後の治療法選択に大きな情報を提供する事が出来た。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、本研究班の目的の達成できた。

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、特に HLA-B*52:01 に相関した Pol 領域の変異の病態進行における重要性を聡明した。CTL により獲得した変異と薬剤耐性変異の相乗効果を証明できた。4種類の臨床試験への導出可能な薬剤候補を開発した。

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. 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

2. 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** 16:434-438, 2014
3. Nozomi Kuse, Mohammad Arif Rahman, Hayato Murakoshi, Giang Van Tran, Takayuki Chikata, Madoka Koyanagi, Kinh Van Nguyen, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Different effects of NNRTI-resistance mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections. **J. Virol** In press

湯永博之

1. 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
2. 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** 16:434-438, 2014
3. Nozomi Kuse, Mohammad Arif Rahman, Hayato Murakoshi, Giang Van Tran, Takayuki Chikata, Madoka Koyanagi, Kinh Van Nguyen, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Different effects of NNRTI-resistance mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections. **J. Virol** In press

松下修三

1. Ramírez, K.P., Kuwata, T., Maruta, Y, Tanaka K., Muntasir, A., Yoshimura, K., Matsushita, S. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. **Virology**, 475:187-203, 2015.

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'-deoxyadeno -sine: 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

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 NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, and Y181V) の 3 つの異なったエピトープを認識する CTL に与える影響を、subtype B と subtype AE 感染患者で解析した。Subtype B 感染者では 3 つの CTL の認識をすべての変異は低下させたが、subtype AE では NY9 特異的 CTL への影響は少なかった。

A. 研究目的

報告されている薬剤耐性変異が CTL の認識にどのような影響をうけるかを昨年度に引き続き解析した。今年度は、NNRTI により誘導された耐性変異 RT181 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. NNRTI 耐性変異 RT181 を含んだ CTL epitope peptide に対する 特異的 CTL 及びその変異 peptide に対する認識

NNRTI 耐性変異として RT181 の変異 (Y181C, Y181I, and Y181V) が報告されている。この RT181 を含めた CTL のエピトープとして知られている、3 つの CTL エピトープペプチド (HLA-A*02:01-restricted IV10; IYQYMDDLY V, HLA-B*35:01-restricted NY9; NPDIVIYQY, HLA-C*12:02-restricted KY9; KQNPDIVIY) とそれぞれの耐性変異を持った変異エピトープペプチドに対する CTL の認識を、ELISPOT assay を用いて調べた。

2. 特異的 CTL clone 及び line の作製とこれを用いたペプチド及びウイルス感染細胞に対する CTL の認識

HIV 感染者からそれぞれのエピトープに対する CTL を誘導して、変異ペプチドに対する認識を ICS assay を用いて調べた。また 3 つの変異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細胞傷害性活性を調べた。

3. 3 つの HLA 分子とのペプチド結合能の測定

RAM-S 細胞を用いた HLA stabilization assay を用いて、各ペプチドの HLA 分子との結合能を測定した

(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、国立国際医療研究センターおよび熊本大学の倫理委員会での承認を得た。

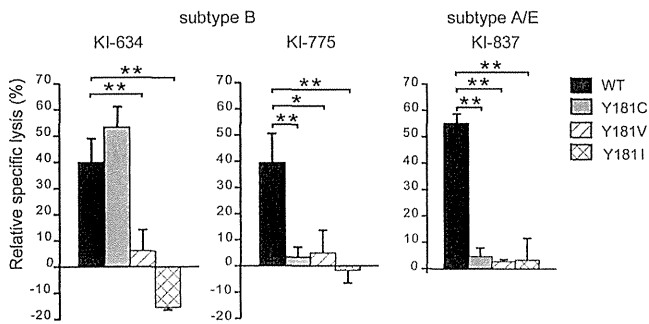
C. 研究結果

1. NNRTI 耐性変異が HLA-A*02:01-restricted IV10 特異的 CTL の認識に与える影響の解析

IV10 特異的 CTL の認識するエピトープ部位の subtype B と subtype AE のシーケンスを感染者で解析した所、ともに IYQYMDDLY が consensus sequence であった。そこで subtype B と subtype AE に感染した HLA-A*02:01 陽性患者の PBMC 内のこの wild-type (WT) ペプチドと 3 つの変異ペプチド (2C, 2I, 2V) に対する特異的 T 細胞数を測定した。subtype B 感染者では WT への反応が見られた 4 名中 3 名で、また subtype AE 感染者では WT への反応が見られた 3 名中 3 名ですべての変異ペプチドへの反応する T 細胞は殆ど見られなかった。一方、1 名の subtype B 感染者 (KI634) では、すべてのペプチドに対する T 細胞が見られた。これらの患者 PBMC から WT ペプチドで誘導して作成した CTL を用いて ICS assay で変異ウイルスに対する反応を調べた所、同様の反応が見られた。

次に各変異が入った3つの変異ウイルスを複製して、WTとこの3つの変異ウイルスに対する認識を調べた所、KI634から誘導されたT細胞はWTと2Cウイルス感染細胞に対して強いさいボス傷害活性を示したが、他の2つ変異ウイルス感染細胞に対しては、傷害活性を示さなかった。他の2名の患者由来のT細胞は、WTウイルス感染細胞のみに細胞傷害活性が見られた(図1)。Peptide binding assayによりこの3つの変異ペプチドは、WTペプチドよりHLA-A*02:01に対して高いaffinityを持っているので、2Iと2Vは抗原提示能とTCRの認識能の低下により、2CはTCRの認識能の低下により感染細胞を認識できないと考えられた。

図1 IV10 特異的 T 細胞による HIV-1 感染細胞の認識



2. NNRTI 耐性変異が HLA-C*12:02-restricted KY9 特異的 CTL の認識に与える影響の解析

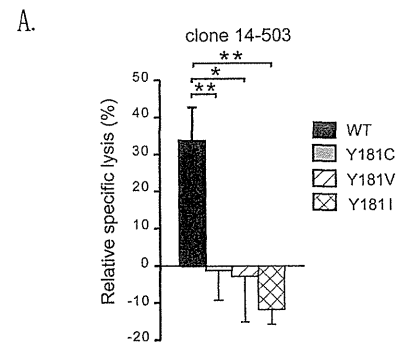
KY9 特異的 CTL の認識するエピトープ部位の subtype B と subtype AE のシークエンスを感染者で解析した所、subtype B では KQNPDIVIY が consensus sequence であったが、subtype AE では4つの変異が入っている sequence が consensus であった。このペプチドを合成し、Subtype AE に感染している HLA-C*12:02 患者で CTL を存在を調べた所全く見つからなかった。このことからこの部位は subtype AE ではエピトープとして認識されていないと考えられた。そこで2名の subtype B 感染者のみ PBMC 内のこの wild-type (WT) ペプチドと3つの変異ペプチド

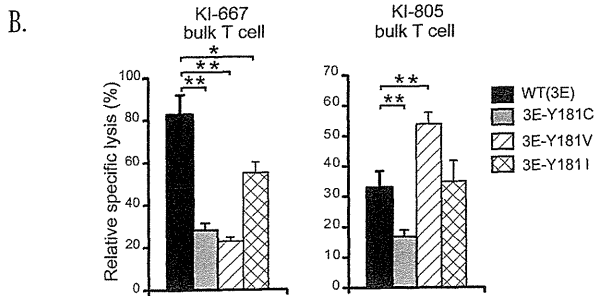
(9C, 9V, 9I) に対する特異的 T 細胞数を測定した。ELISPOT assay では、9I と 9V に対する反応が見られたが、9C に対しては見られなかった。一方、ICS assay では peptide 濃度が濃い所のみその傾向が見られた。変異ウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性を調べた所、いずれの変異ウイルス感染細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった。これらの変異ペプチドは、WT ペプチドに比べて HLA-C*12:02 に対するペプチド結合能も低下していた。これらの事から、ペプチド結合能の低下による抗原提示能の低下により変異ウイルス感染細胞を認識できなかったと考えられる。

3. NNRTI 耐性変異が HLA- B*35:01 restricted NY9 特異的 CTL の認識に与える影響の解析

NY9 特異的 CTL の認識するエピトープ部位の subtype B と subtype AE のシークエンスを感染者で解析した所、subtype B と subtype AE では、NPDIVIYQY と NPEIVIYQY がそれぞれ consensus sequence であった。まず subtype B の感染者に関して調べた。wild-type (WT) ペプチドと3つの変異ペプチド(6C, 6I, 6V) に対する特異的 T 細胞数を3名の HLA-B*35:01 陽性患者で測定した。3名とも明らかに変異ペプチドを認識する T 細胞数は減少した。ICS assay でも認識の低下は確認できた。これらの変異ウイルスに対する細胞傷害活性を調べたところ、すべての変異ウイルス感染細胞の対する細胞傷害活性は見られなかった(図2A)。これらの変異ペプチドの HLA-B*35:01 に対する結合能に差がほとんど見られなかったこのから、これらの変異は TCR の認識に影響を与えていると考えられた。

図2 NY9特異的 T 細胞による HIV-1 感染細胞の認識





次に subtype AE 感染者での認識を調べた。wild-type (WT: NPEIVIQY) ペプチドと3つの変異ペプチド (7C, 7I, 7V) に対する特異的 T 細胞数を3名の HLA-B*35:01 陽性患者で測定した。2名の患者 (KI667, KI805) では3つの変異ペプチドを認識する T 細胞が、WT ペプチドを認識する T 細胞と同等数見られたが、1名の患者 (KI1124) では、7C, 7V を認識する T 細胞数は低下した。KI667 から誘導した T 細胞は、WT ペプチドと比べて同等か低い認識能が見られ、3つの変異ウイルスを感染させた細胞の認識が有意に低下したが、十分な細胞傷害活性を示した。一方、KI807から誘導した T 細胞は、WT ペプチドと比べて同等か高い認識能が見られ、7I および7V ウイルス感染細胞に対しては、WT 感染細胞と比べて変わらないか高い細胞傷害活性を示した (図2B)。これらの変異ペプチドは WT ペプチドと比べて、HLA-B*35:01 に対して強いペプチド結合能を示した。以上の事から、KI667患者では、全ての変異ウイルス感染細胞に対して低い細胞傷害活性が見られたのは、TCR の認識低下とペプチド結合能以外の抗原提示能の低下によるものと考えられ、一方 KI807患者では7C ウイルス感染細胞では抗原提示能の低下のため感染細胞の認識低下が、7I 及び7V ウイルス感染細胞では TCR 認識能が高いペプチド結合能のため、これらの感染細胞の認識が高まったと考えられた。

D. 考察

NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, Y181V) の3つの CTL の認識に与える影響を解析した。HLA-B*35:01 拘束性の NY9 特異的 CTL が認識する CTL エピトープ部位のシーケンスは、3番目のアミノ酸が両 subtype virus 間で異なっており、この3番目が

D から E になることでペプチドの親和性が高まり、変異ペプチドはすべて WT ペプチドより結合能が高まった。このことから、抗原提示能が高まり、より認識されやすくなったと考えられた。

今までの薬剤逃避変異の CTL の認識の研究では、CTL の認識の低下のみがほとんどであったが、今回感染ウイルスの subtype が変わること、認識が高まる例を明らかにすることが出来た。

E. 結論

NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, and Y181V) の3つの CTL の認識に与える影響を、subtype B 感染患者と subtype AE 感染患者で解析した。Subtype B 感染患者では、1名の患者の IV10 特異的 CTL に対する認識を除いて、すべて認識を非常に低下させた。一方、subtype AE 感染患者では、IV10 特異的 CTL に対する認識を低下させたが、NY9 特異的 CTL への影響は部分的であった。以上の結果から、変異の影響は感染ウイルスの subtype で異なることが明らかになった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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** 16:434-438, 2014
- 3) Nozomi Kuse, Mohammad Arif Rahman, Hayato Murakoshi, Giang Van Tran, Takayuki Chikata,

Madoka Koyanagi, Kinh Van Nguyen, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Different effects of NNRTI-resistance mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections. **J. Virol** In press

2. 国際学会での発表

- 1) Mohammad Arif Rahman, Nozomi Kuse, Hayato Murakoshi, Takayuki Chikata, Tran Van Giang, Nguyen Van Kinh, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Masafumi Takiguchi, Effect of NNRTI-resistance Y181C/V/I mutations on HIV-1-specific CTL recognition in subtype B and the subtype A/E infections , 15th KUMAMOTO AIDS Seminar (Kumamoto, Japan) October 1-3, 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 HIV-1 の逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸は、HLA-B*18 拘束性細胞傷害性 T 細胞からの逃避変異の起こる部位であり、新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine に対する耐性変異の起こる場所でもある。rilpivirine 治療失敗時に E138K 変異が最も高頻度に見られるが、この変異のみでは、2.7 倍の rilpivirine 耐性しか賦与できなかった。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いて rilpivirine 治療に失敗した 5 症例の HIV-1 逆転写酵素シーケンスを解析したところ、3 症例に E138K、1 症例に K101E、1 症例に K101P が出現していた。E138K が出現した症例に共通する他の変異として 135 番目のアミノ酸変異が認められた（2 症例で I135T、1 症例で I135L）。他の 2 症例（K101E が出現した 1 症例と、K101P が出現した 1 症例）の 135 番目のアミノ酸は野生型のまま I であった。135 番目の変異と E138K の両方を持つ組み換え HIV-1 を作成したところ、E135T と E138K の組合せで 8.7 倍の rilpivirine 耐性、E135L と E138K の組合せで 9.5 倍の rilpivirine 耐性となった。Rilpivirine 治療失敗時に高頻度に出現する HIV-1 逆転写酵素の E138K 変異は、そのみでは高度な rilpivirine 耐性をもたらさないが、日本人に多い I135T や I135L などと共存すると高度な rilpivirine 耐性をもたらす、臨床的な治療失敗につながると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 の逆転写酵素の 138 番目のアミノ酸は、HLA-B*18 拘束性細胞傷害性 T 細胞からの逃避変異の起こる部位であり、新規の非核酸系逆転写酵素阻害薬である rilpivirine に対する耐性変異の起こる場所でもある。逆転写酵素の E138G 変異、E138A 変異、E138K 変異は、それぞれ HLA-B*18 拘束性細胞傷害性 T 細胞からの逃避変異であり、rilpivirine の薬剤耐性変異でもあるが、未治療患者に見られる頻度や rilpivirine 治療失敗時に見られる頻度が異なっている。未治療患者には E138A 変異が最も高頻度に見られることから、HLA-B*18 拘束性細胞傷害性 T 細胞は E138 変異を誘導しやすいのだろうと思われる。rilpivirine 治療失敗時に E138K 変異が最も高頻度に見られる理由は明らかでないため、この理由を解明する。

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が、それ以外の部分

のシーケンスは公表されていない。そのため、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いて rilpivirine 治療に失敗した症例の HIV-1 逆転写酵素シーケンスを明らかにし、E138K と共存する変異の有無を解析した。また、同定された共通に存在する変異と E138K をともに保有する組み換え HIV-1 を作成し rilpivirine 感受性を解析した。

（倫理面の配慮）

国立国際医療研究センターの患者の HIV-1 シーケ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

実験株である NL4-3 をバックボーンとし、138 番の変異、E138G、E138A、E138K、のそれぞれを組みこんだ組み換え HIV-1 は、5.1 倍、7.1 倍、2.7 倍の rilpivirine 耐性であった。臨床的に rilpivirine 治療に失敗した場合に最も高頻度に認められる E138K が、最も低い耐性しか賦与していなかった。E138K が出現した rilpivirine 治療失敗症例には、何らかの他の変異が存在し、その変異と E138K との共存により、より高度な rilpivirine 耐性が賦与されていると考えられた。

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いて rilpivirine 治療に失敗した 5 症例の HIV-1 逆転写酵素シーケンスを解析したところ、3 症例に E138K、1 症例に K101E、1 症例に K101P が出現していた。E138K が出現した症例に共通する他の変異として 135 番目のアミノ酸変異が認められた(2 症例で I135T、1 症例で I135L)。他の 2 症例 (K101E が出現した 1 症例と、K101P が出現した 1 症例) の 135 番目のアミノ酸は野生型のまま I であった。135 番目の変異と E138K の両方を持つ組み換え HIV-1 を作成したところ、E135T と E138K の組合せで 8.7 倍の rilpivirine 耐性、E135L と E138K の組合せで 9.5 倍の rilpivirine 耐性となった。

D. 考察

E138K では 2.7 倍の rilpivirine 耐性しか賦与できないが、I135T や I135L の変異と組み合わせると、それぞれ、8.7 倍と 9.5 倍という高度の rilpivirine 耐性を賦与できることが明らかとなった。これらの 135 番のアミノ酸変異は、rilpivirine 治療が導入される前から存在しており、I135T や I138L の変異は rilpivirine 治療失敗時に E138K が出現する危険因子になっている可能性が示唆された。135 番のアミノ酸変異は、HLA-B*51 拘束性細胞障害性 T 細胞からの逃避変異であり、日本人感染者に拡がっている変異であるため注意が必要である。

E. 結論

Rilpivirine 治療失敗時に高頻度に出現する HIV-1 逆転写酵素の E138K 変異は、そのみでは

高度な rilpivirine 耐性をもたらさないが、日本人に多い I135T や I135L などと共存すると高度な rilpivirine 耐性をもたらす、臨床的な治療失敗につながると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuse, Akahoshi, Gatanaga, Ueno, Oka, Takiguchi. Selection of T18-8V mutant associated with long-term control of HIV-1 by cross-reactive HLA-B*51:01-restricted cytotoxic T cells. *Journal of Immunology*. 193 (10):4814-4822. 2014.
- 2) Sun, Fujiwara, Shi, Kuse, Gatanaga, Appay, Gao, Oka, Takiguchi. Superimposed epitopes restricted by the same HLA molecule drive distinct HIV-specific CD8+ T cell repertoires. *Journal of Immunology*. 193 (1):77-84. 2014.
- 3) Tanuma, Quang, Hachiya, Joya, Watanabe, Gatanaga, Van Vinh Chau, Chinh, Oka. Low prevalence of transmitted drug resistance of HIV-1 during 2008-2012 antiretroviral therapy scaling up in Southern Vietnam. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 66 (4):358-364. 2014.
- 4) Rahman, Kuse, Murakoshi, Chikata, Gatanaga, Oka, Takiguchi. Raltegravir and elvitegravir-resistance mutation E92Q affects HLA-B*40:02-restricted HIV-1-specific CTL recognition. *Microbes and Infection*. 16 (5):434-438. 2014.
- 5) Chikata, Carlson, Tamura, Borghan, Naruto, Hashimoto, Murakoshi, Le, Mallal, John, Gatanaga, Oka, Brumme, Takiguchi. Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population. *Journal of Virology*. 88 (9):4764-4775. 2014.

2. 学会発表

- 1) 湯永博之. 「HIV 感染症における最新の治療戦略」 HIV/HBV 共感染における TDF を含む ART の意義 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡

- 2) 瀧永博之. 「臨床医が知っておきたい HIV 感染症の治療」最新の抗 HIV 治療ガイドラインの解説 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 3) 石金正裕、青木孝弘、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 播種性ノカルジア症と PML が疑われた AIDS の一例 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 4) 西島健、瀧永博之、柳川泰昭、水島大輔、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. 新たな C 型肝炎感染が注射薬物を使用しない HIV 感染男性同性愛者で増加 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 5) 柳川泰昭、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一、片野晴隆. 当院で経験した HIV 感染合併原発性滲出性リンパ腫の 4 例 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 6) 水島大輔、西島健、青木孝弘、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. MRI にて異常を認めたエイズ脳症 11 例に関する臨床的検討 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 7) 塚田訓久、瀧永博之、水島大輔、西島健、青木孝弘、源河いくみ、渡辺恒二、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 Elvitegravir/Cobicistat/Tenofovir/Emtricitabine 配合錠の使用成績 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 福岡
- 8) 瀧永博之. HIV 感染症「新・治療の手引き」Regimen 変更時の留意点と変更後の Follow-up 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 9) 瀧永博之. HIV 感染症と Aging 「Aging と長期合併症」～高齢化の現状と長期治療の問題点～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 10) 瀧永博之. ART の将来展望 ～INSTI based Regimen の臨床的有用性～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 11) 瀧永博之. 抗 HIV 治療のターニングポイント～ドルテグラビルの臨床的位置づけ～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 12) 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 5 : MSM コミュニティへのサブタイプ B 感染の動態 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 13) 仲里愛、木内英、渡邊愛祈、小松賢亮、大金美和、池田和子、小林泰一郎、柳川泰昭、水島大輔、源河いくみ、西島健、青木孝弘、渡辺恒二、本田元人、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 認知機能低下が疑われた患者における認知障害の関連因子の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 14) 大岸誠人、四柳宏、堤武也、瀧永博之、森屋恭璽、小池和彦. HIV と HCV の重複感染を有する血友病患者における、複数の遺伝子型の HCV バリエーションの潜在的な混合感染に関する次世代シーケンサーを用いた検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 15) 岡崎玲子、蜂谷敦子、服部純子、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、岩谷靖雅、松田昌和、重見麗、保坂真澄、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 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪

- 16) 青木孝弘、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、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。当センターにおける Raltegravir の耐性症例の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 17) 青木孝弘、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、木内英、渡辺恒二、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。当センターにおける Rilpivirine 耐性症例の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 18) 大木桜子、土屋亮人、林田庸総、増田純一、瀧永博之、菊池嘉、和泉啓司郎、岡慎一。日本人 HIV 感染者におけるラルテグラビル薬物動態の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 19) 土屋亮人、林田庸総、濱田哲暢、加籾真吾、菊池嘉、岡慎一、瀧永博之。HIV 患者におけるラルテグラビル髄液中濃度と薬物トランスポーターの遺伝子多型についての検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 20) 塚田訓久、増田純一、赤沢翼、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、源河いくみ、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。当センターにおける初回抗 HIV 療法の動向と新規インテグラーゼ阻害薬の使用経験 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 21) 西島健、田中紀子、松井優作、川崎洋平、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、小林泰一郎、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。尿 $\beta 2$ ミクログロブリンの TDF 腎障害の予測における有用性の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 22) 柳川泰昭、田里大輔、照屋勝治、柴田怜、古川恵太郎、谷崎隆太郎、小林泰一郎、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、菊池嘉、岡慎一。当院における ART 時代の Kaposi 肉腫症例の治療成績・予後 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 23) 柴田怜、青木孝弘、西島健、古川恵太郎、谷崎隆太郎、柳川泰昭、林泰一郎、水島大輔、渡辺恒二、木内英、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 感染症合併ニューモシスチス肺炎の治療におけるステロイド併用期間の検討 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 24) 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-Protease 依存のウイルス増殖能と病態進行性の網羅的解析 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 25) 林田庸総、土屋亮人、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一。血友病の HIV slow progressor 6 例を対象とした deep sequencing による tropism 解析 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 26) 大金美和、塩田ひとみ、小山美紀、柴山志穂美、久地井寿哉、岩野友里、柿沼章子、大平勝美、池田和子、瀧永博之、岡慎一。HIV 感染血友病患者の健康関連 QOL の実態調査 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 27) 塩田ひとみ、大金美和、渡部恵子、坂本玲子、伊藤ひとみ、川口玲、石塚さゆり、山田三枝子、高山次代、羽柴知恵子、鍵浦文子、木下一枝、長與由紀子、城崎真弓、池田和子、瀧永博之、岡慎一。HIV 感染血友病患者の医療と福祉の連携へのアプローチ～療養支援アセスメントシートの検討～ 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪
- 28) 木内英、加籾真吾、細川真一、田中瑞恵、中西美紗緒、定月みゆき、田沼順子、瀧永博之、矢野哲、菊池嘉、岡慎一。成人と新生児における AZT リン酸化物細胞内濃度の比較 第 28 回日本エイズ学会学術講演会 2014 年 12 月 大阪

- ズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 29) 水島大輔、田沼順子、瀧永博之、菊池嘉、Nguyen Kinh、岡慎一. ハノイの腎機能障害を有するHIV感染者におけるテノフォビル使用による腎機能予後 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 30) 木内英、瀧永博之、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、源河いくみ、塚田訓久、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一. プロテアーゼ阻害薬の骨密度低下メカニズムに関する研究 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 31) 本田元人、遠藤元誉、古川恵太郎、柴田怜、谷崎隆太郎、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、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、尾池雄一、岡慎一. HIV感染者における新たな慢性炎症マーカーと動脈硬化症 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 32) 渡邊愛祈、仲里愛、小松賢亮、高橋卓巳、木内英、大金美和、池田和子、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、加藤温、関由賀子、今井公文、菊池嘉、岡慎一. 当院のHIV感染者における適応障害患者のHIV治療状況とカウンセリング介入についての検討 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 33) 小松賢亮、仲里愛、渡邊愛祈、塩田ひとみ、大金美和、西島健、矢崎博久、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV感染者のターミナルケア ―HIV治療に消極的な感染者との心理面接― 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 34) 土屋亮人、瀧永博之、岡慎一. 新規に開発されたイムノクロマトグラフィー法による第4世代HIV迅速診断試薬の臨床的有用性の検討 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 35) 中家奈緒美、小山美紀、木下真里、塩田ひとみ、伊藤紅、杉野祐子、大金美和、池田和子、塚田訓久、田沼順子、照屋勝治、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. 当院における受診を中断したHIV感染症患者の傾向 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 36) 木下真里、池田和子、中家奈緒美、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対応一初診時のコミュニケーションについて― 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 37) 谷崎隆太郎、青木孝弘、西島健、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、渡辺恒二、木内英、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患者の梅毒治療におけるアモキシシリンの治療効果 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 38) 渡辺恒二、永田尚義、柳川泰昭、小林泰一郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、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感染患者における赤痢アメーバ潜伏感染についての検討 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 39) 小林泰一郎、渡辺恒二、古川恵太郎、柴田怜、柳川泰昭、谷崎隆太郎、水島大輔、西島健、青木孝弘、木内英、本田元人、田沼順子、照屋勝治、塚田訓久、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. HIV合併アメーバ性肝膿瘍の発症リスクとしてのHLA対立遺伝子の解析 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 40) 佐藤麻希、早川史織、増田純一、和泉啓司郎、瀧永博之、菊池嘉、岡慎一. DolutegravirとRalpivirineによるSmall tabletへの剤形変更がアドヒアランスの改善につながった症例 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪
- 41) 古川恵太郎、柴田怜、谷崎隆太郎、水島大輔、

西島健、渡辺恒二、青木孝弘、本田元人、矢崎博久、田沼順子、塚田訓久、木内英、瀧永博之、照屋勝治、菊池嘉、岡慎一。免疫再構築症候群による縦隔リンパ節炎を発症し、気管・食道瘻孔形成を認めたが保存的に治療し得た非結核性抗酸菌症の1例 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪

42) 本田元人、中川堯、山本正也、谷崎隆太郎、柴田怜、古川恵太郎、柳川泰昭、小林泰一郎、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、原久男、岡慎一。血友病Aに合併した狭心症に対し冠動脈形成術後の抗血小板療法2剤併用期間短縮を目的としてZotarolimus薬剤溶出ステントを用いた一例 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪

43) Rahman Mohammad Arif, Kuse Nozomi, Murakoshi Hayato, Chikata Takayuki, Tran Van Giang, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Takiguchi Masafumi. Different effects of drug-resistant mutations on CTL recognition between HIV-1 subtype B and subtype A/E infections 第28回日本エイズ学会学術講演会 2014年12月 大阪

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 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

分担研究者 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
外山政明 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 研究員
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。1) については、昨年度より韓国のソウル国立大学と共同で、HIV-1 の TAR (trans-activation element) RNA に作用し、HIV-1 の転写を阻害するペプチドの同定を行った。一方、2) に関しては、HIV-1 に対して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 (CVC) 存在下での長期培養実験を行い、得られた breakthrough ウイルスの KD-247 に対する感受性と gp120 領域のアミノ酸変異について検討した。その結果、breakthrough ウイルスは KD-247 に対する感受性を回復することが明らかとなった。

A. 研究目的

副作用が少なく、アドヒアランスが高いインテグラーゼ阻害薬の登場によって、抗エイズ療法 (antiretroviral therapy ; ART) は、エイズ患者の予後を著しく改善し、ほぼ完成の域に達したと考えられている。しかし、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、一生涯にわたり服薬を続けなければならない。そのため、最近では HIV-1 感染症の治癒 (cure) の達成を目指した研究が精力的に行われている。具体的には、体内に長期間存在する慢性潜伏感染細胞に対し、薬剤を用いてウイルスの遺伝子発現を誘導し、体内の免疫機構によってこれらを排除しようとする試みである。そ

の際に ART を併用すれば、誘導された HIV-1 の健全な細胞に対する再感染を防ぐことが可能であるという考えに基づいている。一方で、これとは反対に、潜伏感染細胞からの HIV-1 の誘導を阻害するような薬剤を開発し、ART をより完全なものにしようとする試みもある。

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 薬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、昨年度まで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た結果、慢性潜伏感染細胞である OM-10.1 細胞からの HIV-1 産生を選択的に阻害する薬剤 C3 を同定することに成功した。そこで、本年度の研究では韓国のソウル国立大学のグループと共同で、TAR RNA に結合することで、HIV-1 の増殖を阻害するペプチドに関する研究を行った。

一方、本研究班内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、研究を進めてきた。これまでのそれぞれの研究において、松下らが同定した gp120-V3 をエピトープとして認識するヒト化単クローン抗体 KD-247 は、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、馬場が武田薬品工業と共同で同定・開発を進めてきた CCR5 阻害薬の cenicriviroc (CVC) は、米国の製薬企業により開発が進み、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、CVC に対する薬剤耐性 HIV-1 の分離にも成功している。

そこで本研究班では、KD-247 に対するエス

ケープ変異株が CVC 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）ために、それぞれが研究を行ってきた。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 CVC の併用による新たな ART の確立を目指している。本報告書では、馬場担当部分に関する今年度の共同研究の成果について報告する。

B. 研究方法

ウイルス：使用する R5 HIV-1 は、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、松下より分与された。ウイルスの増殖と長期継代培養には、当研究室で樹立した CCR5 を人為的に発現させた 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）HIV-1 のタイトレーションおよび抗ウイルスアッセイには、CCR5 を発現し、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）TAR 結合能を有するペプチドのデザインと合成は、ソウル国立大学のグループにより行われた。（2）CVC は、武田薬品工業から分与された。CVC は DMSO に 20 mM の濃度で融解し、使用するまで -20°C にて保存し