

201421007B

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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 滝口 雅文

平成27(2015)年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

- 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……………6  
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……………11  
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……………21  
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……………27  
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……………32  
- 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. 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……………42  
前仲 勝実(北海道大学大学院薬学研究院 教授)
7. 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……………46  
中田 浩智(熊本大学医学部附属病院感染免疫診療部 講師)  
天野 将之(平成 24 年度 熊本大学エイズ学研究センター COE リサーチ・アソシエイト)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………49

### IV. 添付：研究成果の刊行物・別刷

# I. 総合研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金(エイズ対策研究事業(エイズ対策実用化研究事業))  
総合研究報告書  
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: 湯永 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)  
天野 将之(熊本大学 エイズ学研究センター COE リサーチ・アソシエイト)

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)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 [湯永・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 (KK<sub>652-67</sub>) 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、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 [湯永・滝口]。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 耐性をもたらし、臨床的な治療失敗につながると思われた。[瀧永]

2種類の P I 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。さらに 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:

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、KK<sub>652-67</sub> 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。KK<sub>652-67</sub> 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]。

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 KK<sub>652-67</sub> と 1C10 逃避株 KK<sub>652-67/1C10-7</sub> 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 KK<sub>652-67</sub> と 4E9C 抵抗性株 KK<sub>652-67/4E9C-11</sub> 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、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。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た。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思われた。

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

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 HIV-1 の種類によりその効果は異なることが明らかになった。

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。また Tat/TAR RNA と cyclin T1/CDK9 の相互作用を標的とする新規薬剤を開発した。今後これらの薬剤の臨床試験が期待できる。

## 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がある変異 (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示せた。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。さらに薬剤耐性変異の CTL の認識に与える影響を subtype B 及び subtype AE で明らかにできた。

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3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 を同定した。さらに 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

本3年間の成果より、臨床への貢献する研究へ繋げる研究に発展する事が強く期待できる。

## 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、特に HLA-B\*52:01 に関連した 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。更に CCR5 阻害剤 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. 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

#### 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<sup>+</sup> 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.*4:933-94, 2013.
2. 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'-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

#### 天野将之

1. Masayuki Amano, Yasushi Tojo, Pedro Miguel Salcedo-Gómez, Joseph Richard Campbell, Debananda Das, Manabu Aoki, Chun-Xiao Xu, Kalapala Venkateswara Rao, Arun K. Ghosh, and Hiroaki Mitsuya. GRL-0519, A Novel Oxatricyclic-Ligand-Containing Nonpeptidic HIV-1 Protease Inhibitor (PI), Potently Suppresses The Replication of a Wide Spectrum of Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2036-2046,2013
2. Aoki, M., Danish, M.L., Aoki-Ogata, H., Amano, M., Ide, K., Koh, Y, and Mitsuya, H. Loss of protease dimerization inhibition activity of tipranavir (TPV) is associated with HIV-1 acquisition of resistance to TPV. *J. Virol.* 86(24):13384-13396,2012
3. Ghosh AK, Chapsal BD, Steffey M, Agniswamy J, Wang Y-F, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. Substituent effects on P2-cyclopentyltetrahydrofuranylethanes: Design, synthesis, and X-ray studies of potent HIV-1 protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(6): 2308-2311, 2012

#### 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、細胞性免疫により選択された逃避変異の候補を明らかにした。また薬剤耐性変異が CTL の認識に与える影響の解析では、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。2 つの subtype 間での影響は、3 つの CTL の内、NY9 特異的 CTL への影響のみで違いが見られ、subtype AE では影響は少なかった。

### A. 研究目的

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 アレルと相関する 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 のアレルを解析した。これらのデータから、それぞれの HLA アレルに相関する変異 (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. 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 (表 1)、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 に関連した HLA-AP が VL と逆相関を示すことを明らかにした。また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。

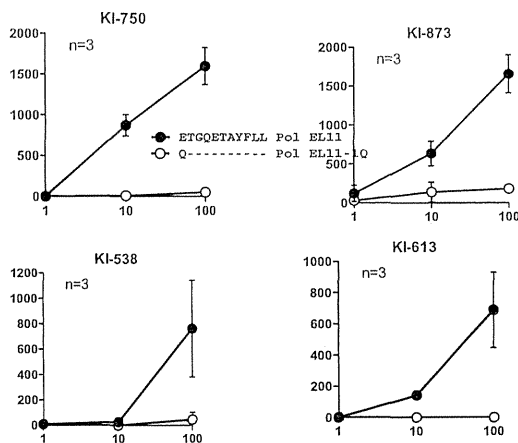
表 1 : 日本人 HIV-1 感染者における HLA-AP

Gene	HLA-A-associated polymorphism		HLA-B-associated polymorphism		HLA-C-associated polymorphism		Total
	Adapted	Nonadapted	Adapted	Nonadapted	Adapted	Nonadapted	
GAG	12	15	26	24	8	9	94
POL	11	8	23	22	14	8	86
NEF	17	15	21	24	11	16	104
Total	40	38	70	70	33	33	284

Table 1. Number of HLA-APs in HIV-1 Gag, Pol, and Nef in the Japanese cohort  
Nonadapted: amino acids are abundant in the "absence" of a given HLA allele.

## 2. 薬剤耐性変異がCTLの認識に与える影響の解析 (1) Integrase 阻害剤耐性変異(Int 92)が CTL の認識に与える影響

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



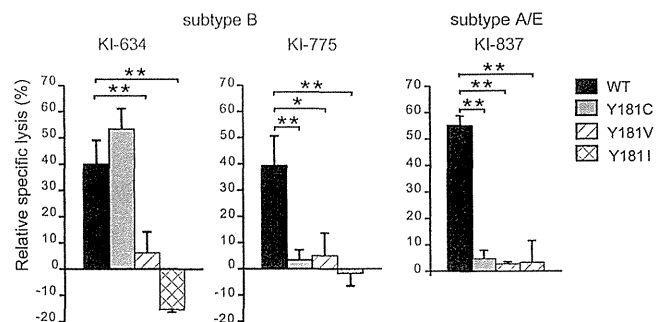
(2) NNRTI 耐性変異 RT181が3つのCTL (HLA-A\*02:01-restricted IV10 特異的 CTL、(HLA-B\*35:01-restricted NY9 特異的 CTL、(HLA-C\*12:02-restricted KY9 特異的 CTL,)の認識に与える影響

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作製して、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2)。

図2 IV10 特異的 T 細胞による HIV-1 感染細胞の認識



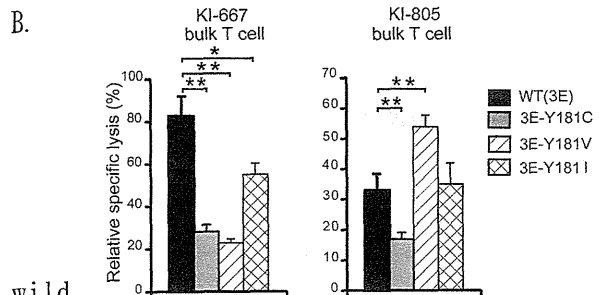
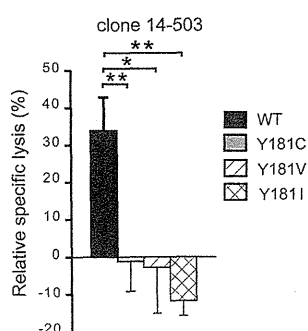
Peptide binding assay によりこの3つの変異ペプチドは、WT ペプチドより HLA-A\*02:01 に対して高い affinity を持っているため、2I と 2V は抗原提示能と TCR の認識能の低下により、2C は TCR の認識能の低下により感染細胞を認識できないと考えられた。

KY9 特異的 CTL の認識するエピトープ部位の subtype B と subtype AE のシーケンスを感染者で解析した所、subtype B では **KQNPDIYIY** 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、SubtypeAE 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 subtypeAE ではエピー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 subtypeB 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性活性を調べた所、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。

NY9 特異的 CTL の認識するエピートープ部位の subtype B と subtype AE のシーケンスを感染者で解析した所、subtype B と subtype AE では、NPDIVIQY と NPEIVIQY 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性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性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。次に subtype AE 感染者での認識を調べた。

図 3 NY9 特異的 CTL による HIV-1 感染細胞の認識



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性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

430 人の無治療、HIV-1 慢性感染者を用いた 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 の多くのは、CTL からの逃

避変異として報告されておらず、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。

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。一方、NNRTI 耐性変異として報告されている RT181 の変異 (Y181C, Y181I, Y181V) では、subtype B 感染者では CTL の認識を低下させ、一方 subtype AE 感染者では一部の患者では認識が変わらないか高める効果も見られた。

## 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) をアジアでは網羅的に始めて明らかにした。特に Pol に見られた HLA-AP に数と pVL が負の相関、CD4 数とは正の相関がみられ、逃避変異によるウイルス増殖能の低下が推定された。

2. 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 に与える影響は、subtype B 感染者では特異的 CTL の認識を低下させたが、subtype AE 感染患者では NY9 特異的 CTL への影響は少なく、影響は多様であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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

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) 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) 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

4) 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

5) 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

6) 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 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。

rilpivirine 治療に失敗した 5 症例の HIV-1 逆転写酵素シークエ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 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 に適応して拮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 $\gamma$  の再生を調べた。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

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 番目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換え 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。

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

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。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

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。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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hasan Z, Carlson JM, Gatanaga H, Le AQ, Brumme CJ, Oka S, Brumme ZL, Ueno T. Minor contribution of HLA class I-associated selective pressure to the variability of HIV-1 accessory protein Vpu. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 421(0):291-295. 2012.
- 2) 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*. 57(0):1051-1055. 2013.

- 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) Tanuma, Quang, Hachiya, Joya, Watanabe, Gatanaga, Van Vinh Chau, Chinh T, 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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 感染症の現状と将来の展望 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月 長崎
  - 2) 湯永博之. HIV 感染症の治療ガイドライン Update—ガイドラインに基づいた治療の実際 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月 長崎

- 3) 瀧永博之. 最新の情報を明日の臨床に活かす—Year in Review 2012— 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
- 4) 瀧永博之. NNRTI—その充実と今後の展望を考える 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
- 5) 小柳円、赤星智寛、Philippa Matthews、Henrik Kloverpris、瀧永博之、岡慎一、Philip Goulder、滝口雅文. サブタイプの異なる HIV-1 感染者の予後を左右する細胞障害性 T 細胞の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
- 6) 成戸卓也、瀧永博之、Nelson George、阪井恵子、Carrington Mary、岡慎一、滝口雅文. 日本人集団における HLA クラス I アレルの HIV-1 ウィルス制御の解析 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
- 7) 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、佐藤武幸、上田敦久、石ヶ坪良明、古賀一郎、太田康男、山元泰之、福武勝幸、古賀道子、岩本愛吉、西澤雅子、岡慎一、伊部史朗、松田昌和、林田庸総、横幕能行、上田幹夫、大家正義、田邊嘉也、白阪琢磨、小島洋子、藤井輝久、高田昇、山本政弘、松下修三、藤田次郎、健山正男、杉浦互. 新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性 HIV の動向 第 26 回日本エイズ学会総会・学術集会 2012 年 11 月 横浜
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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/ $\mu$ 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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

- 19) 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
- 20) 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/ $\mu$ 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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 一当院マラビロク治療症例の場合一 第 27 回日本エイズ学会学術講演会 2013 年 11 月 熊本
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 瀧永博之。「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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 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