

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510208  
 研究課題名（和文） 多剤併用治療下のエイズウイルスの分子進化解析と薬剤耐性獲得機構の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of within-patient HIV-1 evolution and drug resistance mechanisms under anti-HIV therapy  
 研究代表者  
 任 鳳蓉（REN FENGRONG）  
 東京医科歯科大学・情報処理センター・特任准教授  
 研究者番号：60280989

## 研究成果の概要：

(1) HIV 宿主内進化過程を推定するための計算アルゴリズム vSPA を開発した。AIDS 患者 2 症例から経時的に得られた 1000 個近い HIV-1 サンプルへ適用した結果、薬剤耐性獲得に関連する突然変異などを検出することができた。

(2) バイオインフォマティクス手法を用いて、抗 HIV 剤治療を受けた 1 症例より経時的に採取した HIV-1 サンプルから、Gag と PR 遺伝子間の共進化突然変異を推定した。さらに *in vitro* 実験を行い、これらの同時変異が機能的に有意であることを確認した。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合・新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム

キーワード：HIV 宿主内進化、連続 HIV サンプル、薬剤耐性変異、共進化解析、SGS 法

## 1. 研究開始当初の背景

HIVの発見から20年以上を経ったが、感染者の数は依然として世界規模で年々増加し、エイズは未だに人類を脅かしている脅威の1つである。90年代から始まった多剤併用抗 HIV 治療法 — HAART (Highly Active

Antiretroviral Therapy) が大きな成果を挙げたが、薬剤耐性ウイルスの出現は新しいチャレンジになっている。バイオインフォマティクスの手法を活用し、急速に蓄積されてきた多様な HIV データ、特に同一患者からの連続サンプルを迅速に解析し、多剤併用治療下の

HIV宿主内進化過程及び薬剤耐性獲得機構の解明に有用な情報を提供する研究が必要とされた。

## 2. 研究の目的

### (1) 連続サンプルによるHIV宿主内進化解析法の開発

HIVの進化速度は非常に速いため、同一患者から連続サンプルを採取することが可能であり、連続サンプルの解析により実時間でその進化過程を観測することができる。しかし、いままでの伝統的な分子進化系統樹作成法、例えば最尤法や近隣法は、同時点の分子データの系統関係を推定するために開発されたものであるため、分子データの時間的な前後順序を考慮していない。また、HAARTを受けるエイズ患者体内でのHIV進化は多種類の抗HIV剤の攻撃により非常に複雑な過程であり、進化の途中で絶滅したウイルスもあれば一旦消えてから（頻度が非常に低くなる場合）再び現れるものもある。さらに、多剤組み合わせで投与することにより、異なる耐性変異を保有する複数のウイルス準種集団（類似性が非常に高いが完全に同じではないウイルス集団）が異なる頻度で同時に存在することが予測される。このようなダイナミックな進化過程を時系列的に解析するために、我々は計算プログラム vSPA (virus Sequential Pathway Analysis) を開発することを試みた。宿主内におけるHIVの進化過程を推定することにより、様々な抗HIV剤組合せに対する薬剤耐性変異獲得の情報を迅速に検出することがこの研究の目的であった。

### (2) PRとGagの共進化に関する解析

抗HIV薬剤耐性研究においてもう1つのチャレンジは異なるHIV遺伝子間の共進化である。プロテアーゼ (PR) 阻害剤耐性を獲得したHIVではしばしばGag遺伝子にも、耐性を獲得したPRとの結合を回復させる変異が獲得されることが知られている。この現象はGagとPRが互いに干渉しながら進化をしている（共進化）ためであると考えられるが、その詳細は未だ明らかとなっていない。今までこの共進化の解析に2つの難題があった：①遺伝子間の繋結が保障される形での遺伝子増幅と配列解析を行うことが必要であるが、従来の実験法では遺伝子増幅時に人為的組み換えが10%~20%の頻度で生じてしまい解析誤差となってしまう。②共進化に関する計算法も従来の手法では擬陽性の検出が多く解析の大きな障害となる。そこで、我々は最新のシーケンシング技術と共進化解析法をこの研

究に適用し、異なるHIV遺伝子 (Gag、PRとRT) の間で起こる薬剤耐性獲得に関連する共進化変異を探索する研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) vSPAアルゴリズムの開発

vSPAアルゴリズムは大きく二つのステップに分かれる。まず、各サンプリング時点で採取したウイルスデータをその類似性からクラスタリングを行う (図1)。そして、進化距離に基づき、クラスターのレベルで時点間のウイルス進化パスウェイを推定する (図2)。このアルゴリズムは以下のような特色がある：①サンプルの採集時間や前後順序の情報を取り入れたウイルス進化パスウェイを構築することができる。②伝統的な系統樹と比べ、ウイルス準種の系統関係を推定するだけでなく、多様なウイルス準種の出現から消滅までの動的な進化過程を表現することもできる。③ウイルスの進化過程をグラフィックツールで可視化した。④経時的に変化するアミノ酸頻度も推定されるため、投与した薬剤や臨床情報と照合すれば、薬剤耐性獲得に関連する突然変異を検出することができる。

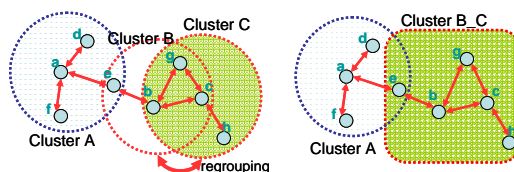


図1 クラスタリングの模式図。隣接2時点（サンプリング時点）のウイルス配列を用いて進化距離行列を計算し、その距離行列から相関係数行列を作成する。コドンレベルでpermutationテストを行い、各時点におけるウイルス配列の相関係数閾値を推定する。その閾値を用いてクラスタリングを行う。2つのクラスター間で共通の配列と全体の配列の比が0.5以上である場合、2つのクラスターを統合する。

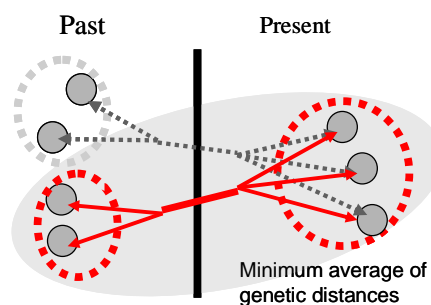


図2 進化パスウェイを推定する模式図。過

去と現在のウイルスクラスター間における進化距離の平均値を計算し、この値が最小となる過去のクラスターを祖先クラスターとする。

## (2) PR と Gag の共進化解析

まず、米国の研究グループに最近開発された遺伝子間のリンケージが保障された SGS 法 (Single Genome Sequencing) を再現することに成功し、異なる遺伝子領域に亘って (Gag-PR-RT) 遺伝子の増幅を行った (2573bp)。計算法について、分子データの系統関係に基づいて共進化サイトを探索するプログラム Spidermonkey BGM を用いた。そして、既知のウイルス学知識に基づいて推定された結果から耐性関連の共進化候補を絞り、さらに *in vitro* 実験を行った。具体的に、野生型の Gag-PR に点変異で共進化変異を導入するウイルスを作製し、複数の抗 HIV 薬剤に対する感受性テストを行って、組換え体ウイルスがもつ PR の Gag の切断効率も測定した。

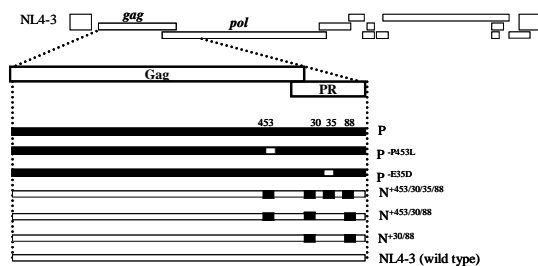


図3 Construction of recombinant viruses. Six different types of recombinants were constructed: (i) P, NL4-3 backbone with patient-derived Gag and PR; (ii) P<sup>minus453</sup>, NL4-3 backbone with patient-derived Gag and PR but P453L<sup>Gag</sup> was converted to wild-type; (iii) P<sup>minus35</sup>, NL4-3 backbone with patient-derived Gag and PR but E35D<sup>PR</sup> was converted to wild-type; (iv) N<sup>+453/30/35/88</sup>, NL4-3 backbone including the substitutions of P453L<sup>Gag</sup>, D30N<sup>PR</sup>, E35D<sup>PR</sup> and N88D<sup>PR</sup>; (v) N<sup>+453/30/88</sup>, NL4-3 backbone including the substitutions of P453L<sup>Gag</sup>, D30N<sup>PR</sup>, and N88D<sup>PR</sup>; (vi) N<sup>+30/88</sup>, NL4-3 backbone including the substitutions of D30N<sup>PR</sup> and N88D<sup>PR</sup>.

## 4. 研究成果

### (1) vSPAアルゴリズムの開発

国立感染研エイズ研究センターのご協力を得て、vSPA を AIDS 患者 2 症例 (Patient1、Patient2) から経時的に採取した 1000 個近い HIV-1 PR と RT 遺伝子のサンプルへ適用し、経時的なウイルス進化パスウェイを構築し

た。そのパスウェイに沿ってアミノ酸頻度変化を計算することにより、既知の薬剤耐性変異を多数検出しただけでなく、今まで報告されていない 2 つの耐性変異間の共進化関係も見出した。これらの結果は、薬剤耐性変異獲得メカニズムの解明や抗 HIV 治療の予後予測などに対して、重要な情報を提供できると考えられる。

この研究の成果は以下の論文にまとめ、すでに国際誌に投稿した。掲載が決まり次第、vSPA プログラムも Web 上で公開する予定である。

Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA

Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F\*, Tanaka H

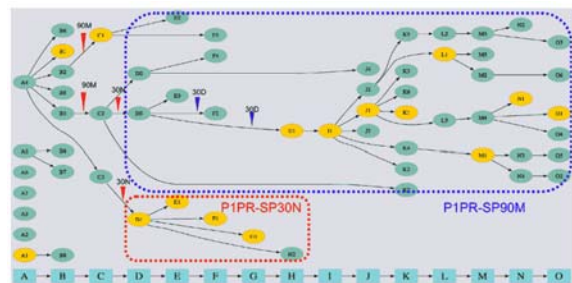


図4 vSPAにより推定した Patient1 の PR 遺伝子 (273 配列) の進化パスウェイ。赤の点線で囲ったウイルス準種集団と、青の点線で囲った準種集団が、H 時点を境にメイン集団として入れ替わったことが分かった。前者は PR 阻害剤 NFV の耐性変異 D30N を獲得し、NFV が投与された時期 (C 時点から F 時点まで) に高頻度 (黄色のクラスターで示す) で存在した。A-O: サンプル時点。

### (2) PR と Gag の共進化

52 ヶ月間抗 HIV 剤治療を受けた 1 症例 (38 歳の日本人男性) より経時的にウイルスサンプルを採取し、HIV-1 RNA を抽出後、SGS 法により合計 129 クローンの Gag-PR-RT 領域のクローニングを行った。得られたウイルスサンプルについて Spidermonkey BGM を用いて解析したところ、8 つの共進化ペアが推定された。その中でも、Gag の切断点近傍に位置する P453L が PR 阻害剤 NFV 耐性変異である PR の D30N および N88D と共進化していることに注目した。共進化の有意性について *in vitro* の実験系にて確認したところ、NFV の存在下において P453L, D30N, N88D をもつウイルスクローンは D30N, N88D のみをもつクローンに比べ明らかに高い増殖能力を示したことから、これらの変異の組合せが機能的に有意である

ことが確認された。さらに興味深いことに、今まで認識されていない Gag-RT 両遺伝子間にも共進化変異が存在することが明らかとなった。

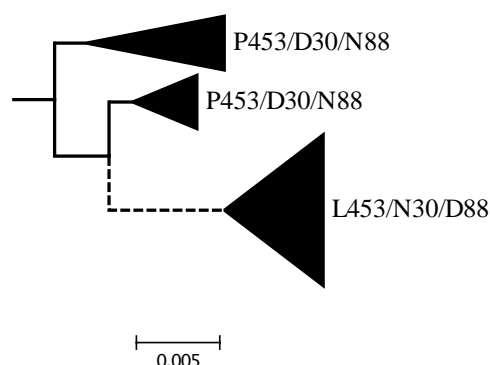


図5 Spidermonkey 法で推定された共進化変異を近隣法で作成した系統樹にマッピングした結果である。共進化変異が起きた枝を点線で示した。

この研究成果について、すでに英文論文を作成し、近いうちにウイルス系国際誌に投稿する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Ren F, Tanaka H, Yang Z. A likelihood look at the supermatrix-supertree controversy. *Gene*, ePub 10 April, 2008 (査読有)
- 2) Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T, Tanaka H\*, Miura K. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 36(3):861-871, 2008 (査読有)
- 3) Shibata J, Ren F, Nishizawa M, Fujino M, Iwatani Y, Matsuda M, Miura H, Tanaka H, Sugiura W. Interference between Gag Non-Cleavage Site Mutation P453L and HIV-1 Protease Non-Drug Resistance Mutation E35D. *Antiviral Therapy* 12:S143, 2007 (査読有)

[学会発表] (計10件)

- 1) Ren F: Analysis of dynamic HIV evolution and drug resistance acquisition under anti-HIV therapy using bioinformatic methods. The Second China-Japan Colloquium of Mathematical Biology. August 4, 2008, Okayama.

- 2) Shibata J, Nishizawa M, Matsuda M, Sugiura W, Ren F, Tanaka: Analysis of Co-evolution between Mutations in Protease Inhibitor Resistance and in Gag. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 25, 2007, Los Angeles, USA
  - 3) Shibata J, Ren F, Nishizawa M, Fujino M, Iwatani Y, Matsuda M, Miura H, Tanaka H, Sugiura W: Interference between Gag Non-Cleavage Site Mutation P453L and HIV-1 Protease Non-Drug Resistance Mutation E35D. 16th International HIV Drug Resistance Workshop. June 12, 2007, Bridgetown, Barbados
  - 4) Shibata J, Ren F, Nishizawa M, Tsang H, Iwatani Y, Matsuda M, Miura H, Tanaka H, Sugiura W: Gag and protease co-evolution in an antiretroviral treatment failure case. 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance: Targets and Mechanisms. November 11, 2007, Virginia, USA
  - 5) 吉田いずみ、任鳳蓉、柴田潤子、杉浦互、岩谷靖雅、田中博: HIV-1 *env* 遺伝子の多様性進化とその様式に関する解析、日本ウイルス学会、岡山、2008年10月
  - 6) 長谷川直紀、杉浦互、任鳳蓉、松田昌和、柴田潤子、田中博: HAART 下における連続サンプルを用いた経時的な HIV の宿主内進化解析、第21回日本エイズ学会、広島、2007年11月
  - 7) 柴田潤子、任鳳蓉、西澤雅子、藤野真之、松田昌和、岩谷靖雅、杉浦互、田中博: 抗 HIV 薬剤投与下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析。第21回日本エイズ学会、広島、2007年11月
- 他3件

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

任 鳳蓉 (REN FENGRONG)

東京医科歯科大学・情報処理センター・特任准教授

研究者番号: 60280989

(2) 研究分担者

田中 博 (TANAKA HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・教授

研究者番号: 60155158