

機関番号：37409

研究種目：若手 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790527

研究課題名（和文） HIV の高度薬剤耐性付与遺伝子変異の解析と耐性発現の克服

研究課題名（英文） Role of HIV Gag mutations in acquisition of resistance to protease inhibitors.

研究代表者 青木 学

（熊本保健科学大学・保健科学部・講師）

研究者番号：70389542

研究成果の概要（和文）：

HIV のプロテアーゼ阻害剤（PI）の一つであるアンプレナビル（APV）耐性 HIV 変異体で 6 個の Gag 変異を同定した。この Gag 変異を導入した感染性 HIV クローンは、野生型 HIV よりも早期に APV 耐性を獲得したが、別の PI であるネルフィナビル（NFV）に対しては遅延した。これは PI の曝露によって起こる Gag 変異が HIV の PI に対する耐性獲得に影響することを示唆しており、Gag 変異の解析は薬剤の選択等、治療において有用であると思われる。

研究成果の概要（英文）：

We have identified six amino acid substitutions in the Gag region in *in vitro* selected amprenavir (APV)-resistant viruses. An infectious recombinant HIV-1 clone carrying the Gag mutations developed APV resistance more quickly than wild-type HIV-1, however it delayed the acquisition of resistance against nelfinavir (NFV) which is another PI, suggesting that antiretroviral regimens including both APV and NFV may bring about favorable antiviral efficacy. The present data suggests that the preexistence of certain Gag mutations related to PI resistance can accelerate the emergence of resistance to the PI and delay the acquisition of HIV resistance to other PIs. These findings should have clinical relevance in the therapy of HIV-1 infection with PI-including regimens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2100000	630000	2730000
2010 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計			4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：HIV、薬剤耐性、プロテアーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

逆転写酵素阻害剤（reverse transcriptase inhibitor: RTI）とプロテアーゼ阻害剤（protease inhibitor: PI）を組み合わせた多剤併用療法（highly active antiretroviral therapy: HAART）の導入によって、HIV 感染症は「制御可能な慢性感染性疾患」へと変貌した。しかし一方で、HIV が RTI と PI に対して耐性を獲得、

しかもその多くが交叉耐性を示すことから治療に抵抗する症例が増加、更には初感染時すでに薬剤耐性 HIV に感染する例が本邦でも増加しており、結果として不完全なウイルス抑制による治療失敗の重要な原因となっている。このような現状から、新しい作用機序を有する薬剤の開発や従来のクラスで多剤耐性株にも強力な活性を発揮し、また耐性

を獲得し難い新規抗HIV剤の開発が急務である。また同時に、薬剤耐性ウイルスの出現の阻止法および治療法の確立また早期検出系の確立は、今後のHIV感染症治療の大きな課題である。HIVの薬剤耐性獲得のメカニズムは未だ不明な点が多いが、PIに対する耐性発現では、ウイルスプロテアーゼ (PR) へのアミノ酸置換の蓄積だけではなく、その基質であるGagウイルス構造タンパク質のPRによる切断部および非切断部にアミノ酸置換が生じることが知られている。そのようなGag変異は、耐性変異を獲得したPRによるGagの切断をし易くするなどして、PRの減弱した酵素活性を代償、結果としてHIVは増殖能をある程度維持したままPIに対する耐性を獲得することがこれまでに報告されているものの、Gag変異そのものがPI耐性の獲得に影響するかどうかは不明である。一方、2002年Gatanagaらによる報告では、PI耐性獲得に伴う一部のGag変異はPRの耐性変異よりも早期に出現することを報告しており (Gatanaga & Mitsuya *et al*, *J Biol Chem*. 277: 5952-61, 2002)、Gag変異がPRの耐性変異を誘導している可能性も考えられる。また、複数のPIで誘導された耐性HIVにおいて共通するアミノ酸置換も見出されていることから、このような変異の存在がPIに対する耐性発現に影響する可能性も考えられる。以上のことはPI耐性獲得に伴うGagの変化について更に詳細な解析を加えることにより、治療時の薬剤耐性ウイルス出現の早期予測のインジケータとして応用可能であると考えられ、更にHIV感染者の治療開始および変更時の薬剤の選択に有益な情報を付与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

HIV-1のPIに対する耐性の獲得において、PR領域だけではなくGag領域のPRによる切断部および非切断部のアミノ酸変異の出現が*in vivo* および*in vitro* において同定されている。しかし、それらの変異のPIsに対する耐性獲得における役目や重要性などは十分な解析がなされておらず、更なる詳細な解析により薬剤耐性の出現を予測する、更には遅延させる等の治療法の開発に繋がる事が考えられる。本研究では、(1)現在臨床で使用されているPIであるamprenavir (APV) に対する試験管内での高度耐性HIV-1 変異体を誘導し、耐性獲得に伴う切断部および非切断部などのGag領域に蓄積するアミノ酸変異を同定する。(2) 同定したGag変異について、ウイルスの増殖能やその他HIVの複製において種々に影響するGagの機能に与える影響について解析する。また(3) Gag変異がPIに対する耐性獲得に対して影響するかどうかを検討する。(4) ジェノタイプやフェノタイプの解析から得られるデータより、Gag領域のアミノ酸変異の解析が治療

開始および変更時の薬剤の選択に有益であるか、また治療時の薬剤耐性ウイルス出現の早期予測のインジケータとして応用可能かどうかについて検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)試験管内でのPIに対する耐性誘導は、HIVを含む培養上清と非感染細胞を混ぜ3時間インキュベーションし、細胞のみを薬剤を含む培養液で約一週間培養することで行った。培養中のウイルス複製は、培養上清中のHIV-1 p24抗原量を測定することでモニターし、HIV-1 p24抗原量が200 ng/ml以上蓄積した場合をウイルス継代の目安とした。耐性誘導は各PIの野生型HIV-1株に対するIC<sub>50</sub>値から開始し、5 μMを最終濃度とした。細胞はMT-4細胞をウイルスは実験室株HIV-1<sub>NL4.3</sub>を用いた。(2)ウイルスの増殖能は、感染性HIV-1クローンとMT-4細胞を混ぜてインキュベーションし、細胞のみを培養、培養上清中のHIV-1 p24抗原量を測定することで評価した。(3)薬剤感受性試験は段階希釈した各薬剤と感染性HIV-1クローン、MT-4細胞を混ぜて培養し、一週間後の培養上清中のHIV-1 p24抗原量を測定、その値よりウイルスの増殖を50%抑制する薬剤濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出し評価した。(4)HIV-1 gag及びプロテアーゼ領域の塩基配列決定は、HIV-1感染細胞より抽出したDNAを鋳型とし、nested PCR、サブクロニング後行った。5'LTRおよび逆転写酵素領域に外側および内側プライマーを設計した。Nested PCR産物を適当なvectorにライゲーションし、competent細胞 (DH5α) に形質転換した。サブクロニングのPCR産物を精製し、ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing ReadyReaction KitによってABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, FosterCity, CA) を用いて塩基配列を決定した。(5)感染性組換えHIV-1クローンの作成は、①サブクロニング後の目的の塩基配列を有するプラスミドもしくはsite directed mutagenesis PCRにより部分的に変異を導入したプラスミドを作成、②BssH IIとApa Iで処理、③得られたDNA断片を同様の制限酵素で処理したHIV-1の全長が組み込まれたHIV-1<sub>NL4.3</sub>プラスミドに導入した。gag-プロテアーゼ領域の場合は、②の行程においてBssH IIとXma Iを用い同様に行った。作成したプラスミドはDH5αに形質転換、LB培養液中で増殖させた後に抽出した。(6) ウイルスを得るために、作成したプラスミドリポフェクタミン法により293T細胞に導入し、発現したウイルスをMT-2細胞に感染・増殖させ、培養上清をウイルス液として各実験に用いた。また保存は-80℃で行った。(7)MT-2細胞およびMT-4細胞はRPMI1640で、293T細胞はDMEMで培養を行った。両培養液には10%の割にFCSを、またペニシリン(50 U/ml)

とカナマイシン (50 µg/ml) を加え用いた。

#### 4. 研究成果

(1)現在臨床で使用されている PI の一つであるアンブレナビル (APV) に対する耐性 HIV-1 変異体を試験管内で誘導し PR および Gag 領域のアミノ酸配列を解析すると、PR に 6 個、Gag に も 6 個 (E12K/L75R/H219Q/V390D/R409K/L449F) のアミノ酸置換を同定した。L449F は切断部の変異でその他は非切断部の変異であった。また L75R と H219Q は、Gatanaga らによる報告の通り PR の耐性変異よりも早期に出現を確認した。(2) APV 耐性変異を PR に導入した感染性組換え HIV-1 クロームは著しく増殖能が低下したが、同定した 6 個の Gag 変異を導入すると増殖能の改善が見られた。(3) Gag 変異のうち、PR の変異よりも先に見られた L75R と H219Q を導入した感染性組換え HIV-1 クローム (HIV-1<sup>L75R/H219Q</sup>) と 5 個の非開裂部の変異を導入した感染性組換え HIV-1 クローム (HIV-1<sup>E12K/L75R/H219Q/V390D/R409K</sup>) を作成し、APV に対する耐性獲得の早さを野生型 HIV-1 (HIV-1<sup>WT</sup>) と比較すると、HIV-1<sup>L75R/H219Q</sup> は HIV-1<sup>WT</sup> と同程度であったが、HIV-1<sup>E12K/L75R/H219Q/V390D/R409K</sup> は HIV-1<sup>WT</sup> よりも早く APV 耐性を獲得した。(4) また HIV-1<sup>E12K/L75R/H219Q/V390D/R409K</sup> と HIV-1<sup>WT</sup> を用いて、APV 以外の PI であるサキナビル (SQV)、インジナビル (IDV)、ネルフィナビル (NFV)、リトナビル (RTV) の 4 剤に対しても同様に耐性を誘導すると、SQV と IDV で耐性獲得の早さは同程度であったが、NFV と RTV では HIV-1<sup>E12K/L75R/H219Q/V390D/R409K</sup> で耐性獲得が遅延した。(5) また NFV 耐性関連変異である D30N や N88S は APV に対する感受性を増大させることがすでに報告されているが、本研究で得られた複数個の NFV 耐性変異を導入した感染性 HIV-1 クロームに対しても同様に APV に対する感受性が増大していた。(6) ①以上の結果は、PI の曝露によって起こる Gag 領域の変異は PI 耐性獲得に伴う増殖能の低下を改善するだけではなく、②HIV-1 の PI に対する耐性獲得に大きく関与することを示唆する最初の報告であり (M. Aoki *et al.*, *J Virol.* 83: 3059-3068, 2009)、③また NFV 耐性関連変異が APV に対する感受性を増大させることを併せると、APV と NFV による治療レジメンが良好な抗ウイルス効果を発揮する可能性があることが示唆された。(7) また NFV を含む HAART 中の HIV-1 感染者から、Gag 領域の切断部近傍に 7 アミノ酸から成る挿入変異を同定した。挿入変異を持つ HIV-1 は持たないものと混在して存在したが、NFV 耐性関連変異が獲得されると共に優勢になった。この挿入変異を野生型 PR の感染性 HIV-1 クロームに導入すると HIV-1 の複製は減弱したが、

NFV 耐性関連変異を含むクローンに導入すると複製が増大した。また NFV 以外の IDV および APV 耐性変異を有するクローンの増殖能を同様に改善したが、lopinavir 耐性変異を導入したクローンではむしろ低下した。このことは挿入変異が PR の基質切断部へのアプローチに影響している可能性があり、また *in vivo* においても Gag 領域の変異が PI に対する耐性獲得に影響している可能性が考えられる。(8) 今後の展望としては、①2007 年本邦でも承認、最新の PI であるダルナビル (DRV) は抗 HIV 活性が高く、耐性 HIV-1 が発現し難いことから、臨床での使用頻度が高くなってきている。一方、臨床で DRV が効かなくなる症例も報告されていることから、DRV 耐性に影響する Gag 変異を解析することにより、治療に DRV を選択する場合に有効な情報をもたらすものと思われる。②また DRV と 2005 年米国 FDA に認可された PI であるチプラナビルは、従来の PI が有する酵素活性阻止能だけではなく、PR の二量体阻止能をも有することから、このような薬剤において Gag 変異がどのように影響するかについてのメカニズムを解析することにより、更なる新規薬剤の開発等に有用であると思われる。③PI 耐性獲得に伴う Gag 変異について更に試験管内および HIV 感染者から得られるデータを蓄積することにより、治療開始および治療変更時の薬剤の選択の最適化を目指したデータベースの構築が可能になるものと思われる。またデータベースの精度を向上させるために、実際に HIV 感染症の動物モデルを使用した研究も必要であると考えられる。

#### 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 4 件)

1. Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H. Novel HIV-1 protease inhibitors (PIs) containing a bicyclic P2 functional moiety, tetrahydropyrano-tetrahydrofuran, that are potent against multi-PI-resistant HIV-1 variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 1717-1727, 2011. 査読有り
2. Ghosh AK, Xu CX, Rao KV, Baldrige A, Agniswamy J, Wang YF, Weber IT, Aoki M, Miguel SG, Amano M, Mitsuya H. Probing Multidrug-Resistance and Protein-Ligand Interactions with Oxatricyclic Designed Ligands in HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemMedChem.* 8:1850-4, 2010. 査読有り
3. Tojo Y, Koh Y, Amano M, Aoki M, Das D, Ghosh AK, Mitsuya H. Novel Protease Inhibitors (PIs) Containing Macrocyclic Components and

3(R),3a(S),6a(R)-bis-Tetrahydrofuranylethane (bis-THF) That Are Potent Against Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 3460-70, 2010. 査読有り

4. Aoki M, Venzon DJ, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, Mitsuya H. Non-cleavage site Gag mutations in amprenavir-resistant HIV-1 Predispose HIV-1 to rapid acquisition of amprenavir resistance but delays development of resistance to other protease inhibitors. *J. Virol.* 83: 3059-68, 2009. 査読有り

〔学会発表〕 (計 8 件)

1. M. Aoki, K. Ide, M. L. Danish, Y. Koh, H. Mitsuya. Tipranavir (TPV)-resistant HIV-1 lacks both protease enzymatic inhibition and dimerization inhibition activity. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 27-March 2, 2011. Boston, MA, USA.

2. 青木 学, 井手 一彦, M. L. Danish, 満屋 裕明: Tipranavir 耐性 HIV はプロテアーゼ二量体化阻止能と酵素活性阻止能の双方を喪失している: 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会: 2010 年 11 月 25 日 東京都

3. N. Higash-Kuwata, H. Aoki-Ogata, S. Hattori, T. Nakamura, M. Aoki, S. Okada, H. Mitsuya. Early phase dynamics of HIV-1 infection in hPBM-transplanted NOD/SCID/Jak<sup>3-/-</sup> mice using infectious HIV-1 carrying fluorescent protein mCherry. XVIII International AIDS Conference. July 18-23, 2010. Vienna, Austria.

4. K. Ide, M. Aoki, Y. Koh, M. Amano, D. D. Anderson, B. Chapsal, A. K. Ghosh, H. Mitsuya. Novel HIV-1 protease inhibitors () containing bis-tetrahydrofuran (bis-THF) and a novel polycyclic ligand. XVIII International AIDS Conference. July 18-23, 2010. Vienna, Austria.

5. 青木 学, 井手 一彦, M. L. Danish, 満屋 裕明: Tipranavir 耐性 HIV はプロテアーゼ二量体化阻止能と酵素活性阻止能の双方を喪失している: 第 20 回抗ウイルス療法研究会学術集会: 2010 年 5 月 21 日 熊本県

6. Yasuhiro Koh, M. Aoki, M. Amano, H. Ogata-Aoki, S. Leschenko-Yashchuk, A. Ghosh, and H. Mitsuya. The Binary Protease Inhibitor, Darunavir, Has a High Genetic Barrier to the Emergence of Resistant HIV-1 Variants. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. February 16-19, 2010. San Francisco, CA, USA.

7. 青木 学, こう 康博, 天野 将之, 東條 靖, 満屋 裕明: 複数のプロテアーゼ阻害剤耐性臨床分離株を用いて誘導した tipranavir 耐性 HIV 変異体の解析: 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会: 2009 年 11 月 26 日: 愛知県

8. M. Aoki, Y. Koh, K. Ide, M. L. Danish, H. Aoki-Ogata, H. Mitsuya. The binary mechanism of HIV-1 resistance to tipranavir (TPV): Loss of inhibition of protease catalytic activity and protease dimerization. 49th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. September 12-15, 2009. San Francisco, CA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 青木 学  
(熊本保健科学大学・保健科学部・講師)

研究者番号: 70389542

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: