

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月11日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790163

研究課題名（和文）広範囲なHIV臨床分離株を用いた薬剤耐性誘導システムの樹立と効率的な治療法確立

研究課題名（英文）Establishment of *in vitro* selection system using recent primary isolates, and a new efficient treatment for HIV

研究代表者

原田 恵嘉（HARADA SHIGEYOSHI）

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

研究者番号：30508643

研究成果の概要（和文）：広範囲な新規臨床分離株を用いた、*in vitro* 薬剤耐性誘導システムを樹立し、解析を行った。4種類の抗HIV剤に対する耐性誘導過程において、各抗HIV剤が作用部位とは異なるエンベロープ領域の diversity（多様性）を減少させるのみならず、それぞれの薬剤によって選択するウイルスのエンベロープ領域に違いが見られることを明らかにした。このことは、今後、抗HIV-1療法における侵入・融合阻害剤との組み合わせにおける薬剤選択に重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：*In vitro* selection with anti-HIV-1 drugs were used to obtain genetically heterogeneous primary HIV-1 isolates. Env diversities significantly decreased during *in vitro* selection. Furthermore, these drugs-selected variants had completely different Env sequences from that in the passage control. This study is the first to explore the influence of anti-HIV drugs on genetic bottlenecks in bulk HIV primary isolates containing highly diverse Env sequences using *in vitro* selection methods. *In vitro* selection may be a useful tool for investigating the compatibility of combined anti-retroviral therapy using entry inhibitors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、HIV

1. 研究開始当初の背景

現在の HIV 感染症に対する治療は数種類の抗レトロウイルス薬の有効な組み合わせによる多剤併用療法（cART）が主体となっており、臨床的に大きな効果を上げているが、一方でウイルスが各抗ウイルス薬に対して

耐性を獲得し、その多くが交叉耐性であって治療に抵抗するという問題は臨床・基礎医学の分野で避けて通ることのできない最重要課題となっている（Clavel F and Hance AJ, *N. Engl. J. Med.*, 350:1023-35, 2004）。

この耐性ウイルスの出現という課題を解

決するために、現在までに各抗 HIV-1 剤に対する *in vitro* 耐性誘導解析が進められて成果を上げてきたが、これらの研究には実験室株であるサブタイプ B の CXCR4 指向性 HIV-1 (X4 ウイルス) を T 細胞株に感染させる方法が主に採用されており、*in vitro* の知見と臨床の知見で少なからず乖離が認められるという問題点が存在する。実際に患者体内で感染の主体となっているウイルスは CCR5 指向性 HIV-1 (R5 ウイルス) であり、さらに近年、サブタイプ B 以外の HIV-1 の感染の広がりが世界的に問題となっている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、従来の X4 実験室株ではなく、現在実際に感染者間で伝搬している「リアルタイムウイルスライブラリー」(最近5年以内に臨床サンプルから分離されたウイルスライブラリー)を構築することを目的に、約10名の患者から各種サブタイプの R5-、X4-、および X4/R5 混在-臨床ウイルスを分離する。

次に、新規 HIV-1 治療薬ラルテグラビル (RAL, インテグラーゼ阻害剤) に対する *in vitro* 耐性誘導を、本「リアルタイムウイルス」を用いて行うことで、より *in vivo* に近い耐性変異のデータを得ることを目指している。

また、その他の新規薬剤についてもこの個々の「リアルタイムウイルス」から同様なデータを得ることにより、治療前の有効な薬剤の組み合わせの決定だけでなく、仮に治療に失敗した場合でも、耐性変異後のウイルスに有効な薬剤の組み合わせを先回りして予測できる可能性があり、それぞれの感染者の感染ウイルス毎に細かなオーダーメイド治療ができるようになることを目指している。

それだけでなく、「リアルタイムウイルス」の耐性変異の情報は、次世代の抗 HIV-1 剤の開発にも有用な知見を提供できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 各種サブタイプの R5-、X4-、および X4/R5 混在-臨床ウイルスの分離・解析

まず、約10名の HIV-1 感染患者の末梢血単核球を、抗 CD3 抗体で刺激した健常者由来末梢血単核球と継代培養を行い、その培養上清を 0.22 μ m のフィルターに通したあと、使

用するまで -150°C で保存した。

次に、得られた各臨床分離株の pol 領域および env 領域のシークエンスを行い、サブタイプの同定、および最初に耐性誘導に使用する新規抗 HIV-1 剤 (RAL) の作用部位である インテグラーゼ領域のポリモルフィズムを同定した。

本研究目的に合致するように、サブタイプ B だけでなくサブタイプ B 以外の R5-、X4-、および X4/R5 混在-臨床ウイルスを得た後に、ポリモルフィズムに対する RAL 感受性の影響を細胞傷害性試験の一つである WST-8 アッセイを用いて IC₅₀ を同定し、解析を行った。

(2) リアルタイムウイルスを用いたラルテグラビルに対する *in vitro* 耐性誘導

これまでの各種抗 HIV-1 剤に対する *in vitro* 耐性誘導解析は、実験室株である HIV-1 サブタイプ B の X4 ウイルスを T 細胞株に感染させる方法で主に行なわれてきたが、本研究では、X4 ウイルスだけでなく、R5-臨床分離株および X4/R5 混在-臨床分離株も用いるため、熊本大学感染防御学講座の前田洋助准教授により樹立された CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用いた。

この細胞株は、代表的な実験室 R5 ウイルス株 (JR-FL, Ba-L 等) で合胞体形成がみられ、顕微鏡下に感染の広がりが確認できるため、培養上清中の p24 濃度測定等を行わずに、簡便にウイルス増殖の程度が推測できる (Yoshimura K, et al., *AIDS*, 20:2065-73, 2006, Yusa K, et al., *J. Biol. Chem.*, 280:30083-90, 2005)。

具体的には、各 IC₅₀ 濃度の RAL 存在下で、50%組織培養感染濃度 (TCID₅₀) の 200 倍の濃度 (200TCID₅₀) の各臨床分離ウイルスを PM1/CCR5 細胞に感染させて、培養した。ウイルスの増殖については細胞傷害効果 (cytopathic effect; CPE) で確認した。培養して 5-8 日目で培養上清を回収し、次の継代のウイルス液として使用し、これを 1 パッセージとした。CPE が早くみられる毎に RAL の濃度を上昇させた。各パッセージにおける RAL に対する耐性度は WST-8 アッセイにより判定し、WST-8 アッセイにより逃避ウイルスの誘導が確認できたところで、これらのウイルスのインテグラーゼ領域のシークエンスを行い、耐性能付与責任変異部位の特定を行った。

また、本研究では「リアルタイムウイルス」(新規臨床分離株)で耐性誘導を行なうことが可能なので、RALの作用部位であるインテグラーゼ領域以外のシークエンスも行ない、ウイルス全体における包括的な経時変化も解析した。最初は、ウイルスの遺伝子領域で最も変化が激しくかつ多様性に富むエンベロープ領域のシークエンスを行なった。

4. 研究成果

(1) 国内 HIV-1 感染者から分離した「リアルタイムウイルス」を用いた *in vitro* ラルテグラビル耐性ウイルス誘導

複数の患者から分離した現在流行している HIV-1 臨床分離株(リアルタイムウイルス)を用いて、新規 HIV-1 治療薬であるインテグラーゼ阻害薬ラルテグラビル (RAL) に対する *in vitro* 耐性誘導を行い、primary 変異の出現をはじめとする耐性機序の検討を行った。

最初に、各 baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列および RAL に対する感受性を解析したところ、リアルタイムウイルス-3 (B, R5, RV-3) およびリアルタイムウイルス-2 (CRF08_BC, R5, RV-2) は、RAL に対し、各々 16, および 32 nM と他のリアルタイムウイルス ($1.2 < IC_{50} < 6.9$) に比べてわずかに感受性が低かったが、今回用いた全ての baseline ウイルスが RAL 感受性であることが示された。これら baseline ウイルスのインテグラーゼ領域のアミノ酸配列を解析したところ、これまでに報告されている RAL 耐性変異および補償変異のいずれも検出されなかったが、RV-2 においては、これまでに報告されていない 5 塩基の挿入変異(NQDME)が 288 残基に認められた。

次に、これら RAL 感受性の baseline ウイルスを用いて、RAL 耐性ウイルスを誘導し、インテグラーゼ領域のアミノ酸配列および RAL に対する薬剤感受性を比較検討した。Hazuda らにより、治療失敗例の患者群で認められる RAL 耐性変異として、L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S, Y143C/H/R, Q148H/K/R, V151I, N155H, および G163K/R が報告されている (Hazuda DJ, et. al., International Drug Resistance Workshop, 2007)。

今回の耐性誘導の結果、G163R および Y143C 変異が、リアルタイムウイルス-4 (B, Mix, RV-4) (21 パッセージ目) および RV-2m

(8 パッセージ目) で各々検出された。他方、これまでに報告がされていない新たな置換である G189R および T210I 変異が、RV-2 (30 パッセージ目) およびリアルタイムウイルス-5 (X4, CRF01_AE, RV-5) (29 パッセージ目) で認められた。また、V31I/R263S 変異が研究室株 89.6 (B, dual) (8 パッセージ目) で検出された。これら以外のウイルスでは、12-25 パッセージ目においてもこれまでに報告されている RAL 耐性変異および補償変異のいずれも検出されていない。

しかしながら興味深いことに、インテグラーゼおよびエンベロープ (Env) 領域において、耐性誘導前のクワシスピーシスから、耐性誘導群と継代コントロール群で明らかに異なった配列を有するウイルスが選択されることが明らかになった。例えば、今回用いた臨床分離株のひとつリアルタイムウイルス-1 (B, Mix, RV-1) では、インテグラーゼ領域において 4 残基でアミノ酸の明白な選択が確認され、さらに、Env 領域においても、V2 挿入をはじめ C1 から V5 までにわたり顕著な配列の違いが 2 群間で認められた。

このように、(i) これまで臨床データのみで認められて *in vitro* では報告されていない RAL primary 変異の Y143C/R 変異や、現在までに一度も報告がされていない新たな関連変異 (G189R など) が *in vitro* で誘導されたこと、および(ii) 薬剤選択圧によるクワシスピーシスの動きを解析できるなど、本システムを用いることで、臨床データ (*in vivo*) により近い耐性機序のデータを得ることが可能なことが示された。

(2) 各種抗 HIV 剤が Env 多様性に与える影響

上述したラルテグラビルに対する *in vitro* 耐性誘導過程において、今回用いたリアルタイムウイルスのひとつ RV-1 では、RAL 継代群とコントロール群の双方で、Env 領域において有意な diversity (多様性) の減少が認められた (継代開始前群=0.056 に対して、各々 0.007 と 0.010)。ところが、RAL 継代群とコントロール群は、明らかに異なる Env を選択し、特に、gp120 全長、V1/V2、と V4 の長さ、および N 型糖鎖付加部位 (PNGs) の数で有意な違いが認められた。

同様の傾向が、今回用いた全てのリアルタイムウイルス株でも認められた。さらに、RV-1 では RAL 以外の抗 HIV 剤として逆転写酵

素阻害剤ラミブジン (3TC)、プロテアーゼ阻害剤サキナビル (SQV)、および CCR5 阻害剤マラビロック (MVC) 存在下においても、同様に Env diversity の低下が認められた (継代開始前群=0.056 に対して、各々0.020, 0.0040, および 0.0080)。しかも、これら各薬剤で選択された Env は、コントロール群に対してだけでなく、各薬剤間でも異なるクラスタリングを示すことが系統樹解析から明らかになった。

以上、各抗 HIV 剤が作用部位とは異なる Env 領域の diversity を減少させるのみならず、それぞれの薬剤によって選択するウイルスの Env 領域に違いが見られることが明らかになった。このことは、今後 cART における侵入・融合阻害剤との組み合わせにおいて薬剤選択に重要な知見となると考えられ、論文にまとめ、投稿準備中である。

(3) V3 領域の CCR5 阻害剤マラビロック感受性に対する影響

上述の研究成果 (1) および (2) の解析において、RAL 選択圧が作用部位とは異なる Env 領域に影響することが明らかになった。そこで、リアルタイムウイルスを用いて CCR5 阻害剤マラビロック (MVC) に対する in vitro 耐性誘導で得られた各種 MVC 耐性株を用いて、RAL に対する in vitro 耐性誘導を行ったところ、Env V3 tip 領域 (P313L 変異) 及び近傍に変異が生じ、MVC に対する感受性を高度耐性から高度感受性に大きく変化させる結果が得られた。V3 変異が MVC 高度感受性をもたらす知見は過去に報告されておらず、現在、組換えウイルスを中心に更なる解析を進めている。この成果は、昨年度開催された国際学会「IAS 2011」で報告し (Abstract number: TUPE089)、数ヶ月中に、学術雑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 6 件)

- ① Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., and Yusa, K. In vitro and In vivo Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. J AIDS Clinic Res, 査読有, 2011.

- ② Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. Bioorg Med Chem, 査読有, 19: 6735-6742, 2011.
- ③ Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. Bioorg Med Chem Lett., 査読有, 20: 5853-5858, 2010.
- ④ Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita S. Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. J. Virol., 査読有, 84: 7558-7568, 2010.
- ⑤ Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. J. Gen. Virol., 査読有, 91: 1335-1345, 2010.
- ⑥ Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K., Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi, T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. Bioorg Med Chem Lett., 査読有, 20: 354-358, 2010.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 原田恵嘉、濱治有希、遊佐敬介、松下修三、吉村和久、抗 HIV 剤が Env 多様性に与える影響、第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、2011.12.1、ハイアットリージェンシー東京 (東京)
- ② Harada S., Ishikawa T., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011.10.21, Aso Resort GRANDVIRIO Hotel (Kumamoto, Japan).
- ③ Harada S., Ishikawa T., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011.7.17, Auditorium Parco della Musica (Roma, Italy).

④ 原田恵嘉、濱治有希、松下修三、吉村和久、ラルテグラビルは HIV-1 の in vitro 馴化における Env 選択に影響する、第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会、2010. 11. 25、ザ・プリンスさくらタワー東京（東京）

⑤ Harada S., Hamji A., Matsushita S., Yoshimura K. Evolution and selection of the env gene of HIV-1 primary isolates during in vitro selection of raltegravir. 11th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2010. 10. 8, Aso Resort GRANDVRIO Hotel (Kumamoto, Japan).

[その他]

<http://yoshimura-project.pl.bindsite.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 恵嘉 (HARADA SHIGEYOSHI)
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
研究者番号：30508643