

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05822

研究課題名(和文) サブサハラアフリカ地域における抗HIV療法下で残存するリザーバーウイルスの解析

研究課題名(英文) Analysis of latently infected HIV-1 circulating in Sub-Saharan Africa

研究代表者

上野 貴将 (UENO, Takamasa)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・教授

研究者番号：10322314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗ウイルス療法(ART)下で残存するHIV-1に関する途上国での情報は極めて乏しい。本研究では、サブサハラアフリカに位置するタンザニア共和国のムヒンビリ医科大学と共同でHIV感染者の前向きコホートを作り、ダルエスサラーム市でHIV陽性者の診療にあたるムヒンビリ国立病院とその周辺の関連診療施設において検体収集を実施した。ART下で残存するHIV-1のウイルス学的、分子疫学的性状と薬剤耐性を解析した。途上国においても多くの感染者がARTを受ける体制が整ってきており、本研究の成果はエイズが蔓延する地域におけるHIV医療の課題解決に貢献できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗ウイルス療法(ART)下で残存するHIV-1に関する途上国での情報は極めて乏しい。途上国においても多くの感染者がARTを受ける体制が整ってきており、本研究の成果はエイズが蔓延する地域におけるHIV医療の課題解決に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Understanding of latently infected HIV-1 variants circulating in developing countries has remained obscure. In this study, in collaboration with Muhimbili University of Health and Allied Sciences (Tanzania), we established a prospective HIV cohort in Dar es Salaam, Tanzania and recruited HIV positive patients at Muhimbili National Hospital and surrounding Care and Treatment Center. We analyzed virological and epidemiological characteristics as well as drug-resistance pattern of latently infected HIV-1 provirus circulating in Tanzania. Results obtained in this study could provide useful information and insights into HIV control in resource-limiting settings such as Sub-Saharan Africa.

研究分野：感染免疫学

キーワード：HIV-1 Sub-Saharan Africa

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国連合同エイズ計画(UNAIDS)の最新の報告「ファクトシート 2014 年世界の状況」によると、2014 年末現在、世界の HIV 陽性者数は 3690 万人、新規 HIV 感染者数は年間 200 万人、エイズによる死亡者数は年間 120 万人となっている。エイズによる死亡数はピークだった 2004 年より 42% 減少したが、いまだ、その脅威は続いている。一方、HIV 感染症の世界的な蔓延は減少してきた。抗ウイルス薬の多剤併用療法(combination antiretroviral therapy: ART)の進歩と、途上国における抗ウイルス薬アクセスの改善が大きく貢献したと考えられる。実際、ART は HIV 感染症の予後改善ばかりでなく、新規感染予防効果が認められている。そして、世界保健機構(WHO)の強力なリーダーシップのもと、「Treat-all policy」が進められることから、世界のほぼすべての地域で抗ウイルス薬へのアクセスが高まる。大きなトレンドの変換が間近に迫っているが、途上国における治療下での基礎ウイルス学的なデータ(リザーバーウイルス、薬剤耐性変異、免疫逃避変異など)は極めて貧弱である。

一方、ART が先行する先進国においては、ART の長期的効果にはいくつかの問題点の克服が必要と指摘されてきた。ART によってウイルスの増殖は阻止され、免疫不全の改善もある程度期待できるもののウイルス自体の排除は困難なため、ART は一生継続しなくてはならない。ART で排除されないリザーバーウイルスの蓄積が懸念されており、その克服を目指した研究が盛んである。しかしながら、感染者の検体を用いたリザーバーウイルス研究のほとんどは先進国をベースに行われており、途上国のデータは極めて乏しい。HIV-1 が最も蔓延しているサブサハラフリカ地域では、先進国とは異なる複数のウイルスサブタイプ(A, C, D)が混在していること、投与される薬剤が異なることから、先進国で得られたデータを安易に適用できない。

タンザニア共和国はサブサハラフリカ地域にあり、HIV 陽性者が成人人口の 5 ~ 6% を占める。女性の感染比率が高いのが特徴である。タンザニアでは多くの途上国と同じく Treat-all policy が推進されている。

2. 研究の目的

抗ウイルス療法(ART)下で残存する HIV-1 の解析は主に先進国の検体で行われており、途上国での情報は極めて乏しい。Treat-all policy による途上国 HIV 医療の転換期にあたり、タンザニア共和国ダルエスサラーム市で HIV 陽性者の診療にあたるムヒンビリ国立病院とその周辺の関連診療施設において検体収集を行う。ART 下で残存する HIV-1 のウイルス学的、免疫学的、分子疫学的性状を解析する。リザーバーウイルスの性状を明らかにすることで、エイズが蔓延する地域における HIV 医療の課題解決に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) HIV-1 感染者コホートの構築

ムヒンビリ医科大学の研究者およびムヒンビリ国立病院の医師との共同研究で、タンザニア共和国ダルエスサラーム市の HIV 感染者診療施設において、HIV-1 感染者の前向きコホートを樹立した。このコホートでは、主に異性間の性的接触によって感染したと思われる成人(ドラッグユーザーを除き)で、妊婦等を除外した。これまでに、抗レトロウイルス薬治療(ART)を受けていないグループ(N=60)、ART を受けたがウイルス量が抑制されていないグループ(N=167)、および ART でウイルス量が抑制されたグループ(N=115)をリクルートした。研究への参加に同意した対象者に対して、診療施設において 10 あるいは 20ml を採血し、ムヒンビリ医科大学微生物学教室に運搬後、PBMC と血漿成分に分離して、それぞれを凍結保存した。

(2) HIV-1 ゲノム RNA およびプロウイルス DNA の調製と薬剤耐性変異の解析

感染者から分離した血漿成分から、ウイルス RNA 精製キット(キアゲン)を用いて、ウイルス RNA を精製した。また PBMC から、ゲノム DNA 精製キット(キアゲン)を用いて、ヒトゲノム DNA を精製した。これらを用いて、ウイルス RNA あるいは DNA コピー数を qPCR で定量した。また、薬剤耐性領域を増幅して、薬剤耐性に関わる変異を解析した。

4. 研究成果

(1) タンザニアで流行する HIV-1 薬剤耐性変異株の解析

タンザニアでは WHO が示した標準的なプロトコールに基づいた ART を実施している(図 1)。HIV 検査をして陽性の結果を得た感染者に対して、その日のうちに ART を開始する。したがって、治療前の検体は、感染者が検査結果を得てから、最初の ART 服用を始める前までの限られた時間取る必要がある。治療前の感染者(60 名)および、1st line での治療失敗症例(137 名)、2nd line での治療失敗症例(30 名)をリクルートして(図 2)、血漿からウイルス RNA を精製して、逆転写酵素およびプロテアーゼ領域を増幅して、遺伝子配列を解析した。始めにサブタイプの同定を試みたところ、サブタイプ A, C, D の他にサブタイプ間の組換えと示唆される例が 30% 程度認められた。薬剤耐性変異を解析したところ、治療失敗例の 90% 以上で非核酸系阻害剤に対する変

異が認められたことから、多くの失敗例では薬剤耐性変異が薬剤の有効性を限定する要因であることが明らかとなった。一方、治療前の症例の概ね 30%で薬剤耐性変異が認められたことから、タンザニアでは耐性変異が非常に多く流行していると危惧された。

Figure 1 Currently used ARV drugs in Tanzania (2019)

1 st line ARV combination (2NRTI + 1NNRTI)	2 nd line antiretroviral therapy (2NRTI + 1 boosted PI)
<ul style="list-style-type: none"> TDF+3TC+EFV (default regimen) TDF + 3TC + NVP TDF + FTC + EFV TDF + FTC + NVP AZT + 3TC+ EFV AZT + 3TC + NVP 	<ul style="list-style-type: none"> NRTIs <ul style="list-style-type: none"> AZT TDF ABC 3TC PIs <ul style="list-style-type: none"> Atazanavir boosted by Ritonavir (ATV/r) Lopinavir boosted by Ritonavir (LPV/r)

Figure 2 Study participants

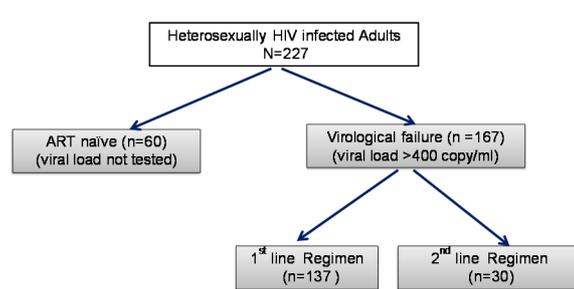


Figure 3 HIV 1 subtype distribution

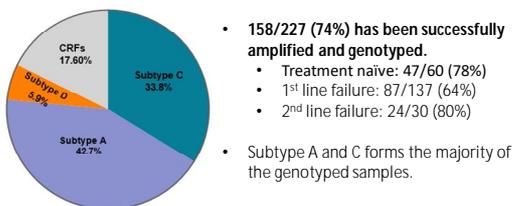


Figure 4 Drug resistance mutations (DRM) in ART naïve patients

ART naïve patients harboring DRMs (major and accessory mutations)

PT ID	PI RESISTANCE MUTATION	NRTI RESISTANCE MUTATION	NNRTI RESISTANCE MUTATION
NV-003	-	-	G190A
NV-004	-	-	G190A
NV-006	-	-	K103N, E138A
NV-008	-	-	E138A
NV-018	-	-	H221HY
NV-019	-	-	E138A
NV-021	-	-	K103KN, V106VM
NV-026	-	-	V179T
NV-027	-	-	K103KN
NV-046	-	E44ED	-
NV-049	-	-	E138A
NV-051	-	D67G	-

(2) ART 下で残存するプロウイルス DNA コピー数

Figure 5 Patient characteristics

Virally suppressed subjects (n=115)	
Demographic data	
Gender -female (%)	96(83.5)
Clinical data	
Median Years on treatment (Range)	9 (2-18) 26 missing data
Median recent CD4 count (Range)	554(119-1303) missing data 57
Median initial CD4 count (Range)	145 (00-1606) 41 missing data
Current ART regimen(%)	
NNRTI based first line regimen	94(81.7)
PI based second line regimen	20(17.4)
missing data	1(0.9)

Figure 6 Approach

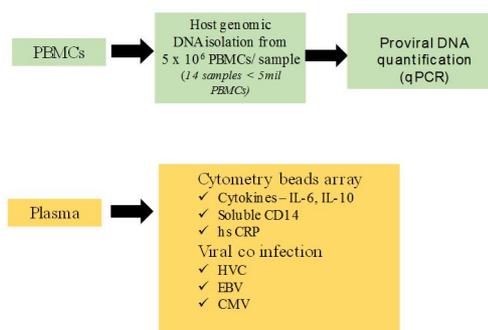
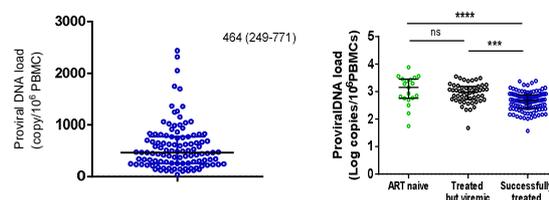


Figure 7 Proviral DNA load in virally suppressed, ART naïve and treated but viremic subjects



Virally suppressed subjects have wide range of proviral DNA copy number but significant lower than the viremic counterpart

次に同じコホートにおいて、薬剤投与を受けて、ウイルス量が抑制されている感染者をリクルー

トした。115 名の対象者の全血を血漿と血球成分に分離後、PBMC からゲノム DNA を抽出して、プロウイルスコピー数の定量を実施した。その結果、プロウイルス DNA コピー数は、感染者ごとに大きく異なる値を示したが、治療歴でグループ化し、中央値を比較すると、治療成功例では失敗例や治療前の感染者に比較して、有意に低かった（図 7）。

(3) ウイルス抑制症例で見られる慢性的な炎症症状

Figure 8 Correlates of proviral DNA load and plasma level of inflammatory biomarkers in virally suppressed subjects

	AGE	Years since ART	Enrollment Age	Initial CD4 count	Recent CD4	Proviral DNA	EBV	CMV	IL-6	IL-10	sCD14	HDL	CRP
AGE		0.23*	0.86***	0.04	-0.05	0.08	0.06	-0.06	-0.02	0.04	-0.08	0.02	0.19*
years since ART	0.23*		-0.13	-0.07	0.36*	0.00	0.08	0.02	0.05	-0.06	0.23	-0.12	0.00
Enrollment Age	0.86***	-0.13		0.13	-0.49**	0.01	-0.11	-0.06	-0.02	-0.14	-0.13	0.13	0.12
Enrollment CD4 count	0.04	-0.07	0.13		0.23	0.06	-0.17	-0.09	-0.23	0.06	-0.05	0.13	-0.21
Recent CD4	-0.05	0.36*	-0.49**	0.23		-0.02	-0.16	-0.25	0.06	0.13	0.10	-0.06	-0.05
DNA	0.08	0.00	0.01	0.06	-0.02		0.03	0.07	-0.01	-0.10	0.05	0.09	0.10
EBV	0.06	0.08	-0.11	-0.17	-0.16	0.03		0.14	-0.06	0.02	0.12	-0.14	0.08
CMV	-0.06	0.02	-0.06	-0.09	-0.25	0.07	0.14		0.02	-0.11	0.12	-0.01	0.03
IL-6	-0.02	0.05	-0.02	-0.23	0.06	-0.01	-0.06	0.02		-0.05	0.30*	-0.13	0.38**
IL-10	0.04	-0.06	-0.14	0.06	0.13	-0.10	0.02	-0.11	-0.05		-0.37**	0.00	-0.02
sCD14	-0.08	0.23	-0.13	-0.05	0.10	0.05	0.12	0.12	0.30*	-0.37**		-0.08	0.02
HDL	0.02	-0.12	0.13	0.13	-0.06	0.09	-0.14	-0.01	-0.13	0.00	-0.08		-0.14
CRP	0.19*	0.00	0.12	-0.21	-0.05	0.10	0.08	0.03	0.38**	-0.02	0.02	-0.14	

さらに、慢性的な炎症に関わるパラメータと、他のウイルス感染の有無を測定して、すべての因子にして相関解析を行った。ここで見られた相関について、検証と機序の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 F Mwimanzi, M Toyoda, M Mahiti, J Mann, J Martin, D Bangsberg, M Brockman, P Goulder, F Kirchhoff, Z Brumme, T Ndung'u, T Ueno	4. 巻 92
2. 論文標題 Resistance of major histocompatibility complex class B (MHC-B) to Nef-mediated downregulation relative to that of MHC-A is conserved among primate lentiviruses and influences antiviral T cell responses in HIV-1-infected individuals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01409-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01409-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kamori Doreen, Ueno Takamasa	4. 巻 8
2. 論文標題 HIV-1 Tat and Viral Latency: What We Can Learn from Naturally Occurring Sequence Variations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers Microbiology	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2017.00080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kamori Doreen, Hasan Zafrul, Ohashi Jun, Kawana-Tachikawa Ai, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Ueno Takamasa	4. 巻 89
2. 論文標題 Identification of two unique naturally occurring Vpr sequence polymorphisms associated with clinical parameters in HIV-1 chronic infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.24612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahiti Macdonald, Toyoda Mako, Jia Xiaofei, Kuang Xiaomei T., Mwimanzi Francis, Mwimanzi Philip, Walker Bruce D., Xiong Yong, Brumme Zabrina L., Brockman Mark A., Ueno Takamasa	4. 巻 7
2. 論文標題 Relative Resistance of HLA-B to Downregulation by Naturally Occurring HIV-1 Nef Sequences	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01516-15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Barabona Godfrey, Mahiti Macdonald, Masoud Salim, Mbelele Peter, Mgunya Amina Shaban, Minja Lilian, Sunguya Bruno, Shigemi Urara, Matsuda Masakazu, Hachiya Atsuko, Iwatani Yasumasa, Lyamuya Eligius, Ueno Takamasa	4. 巻 74
2. 論文標題 Pre-treatment and acquired HIV drug resistance in Dar es Salaam, Tanzania in the era of tenofovir and routine viral load monitoring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Antimicrobial Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 3016~3020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkz272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masoud Salim, Kamori Doreen, Barabona Godfrey, Mahiti Macdonald, Sunguya Bruno, Lyamuya Eligius, Ueno Takamasa	4. 巻 -
2. 論文標題 Circulating HIV-1 Integrase Genotypes in Tanzania: Implication on the Introduction of Integrase Inhibitors-Based Antiretroviral Therapy Regimen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIDS Research and Human Retroviruses	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/AID.2020.0021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takamasa Ueno
2. 発表標題 HIV immune evasion mechanisms and disease association revealed by MUHAS graduates.
3. 学会等名 6th MUHAS SCIENTIFIC CONFERENCE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Godfrey Barabona, Macdonald Mahiti, Salim Masoud, Peter Mbelele, Amina Shaban Mgunya, Lilian Minja, Bruno Sunguya, Eligius Lyamuya, Takamasa Ueno
2. 発表標題 CIRCULATING HIV-1 DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN DAR ES SALAAM TANZANIA; IMPLICATION TO PRE EXPOSURE PROPHYLAXIS.
3. 学会等名 HIVR4P2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Francis Mwimanzi, Macdonald Mahiti, Toyoda Mako, Jaclyn K Mann, Thumbi Ndung'u, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Relative resistance of HLA-B for downregulation by Nef is a fundamental property across lentiviral lineage
3. 学会等名 9th International AIDS Society Conference on HIV Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野貴将
2. 発表標題 MHCとHIV-1 Nefとの相互作用と免疫制御への影響
3. 学会等名 第26回日本組織適合性学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 G Barabona, G Judicate, M Mahiti, S Masoud, D Kamori, P Mbelele, AS Mgunya, L Minja, B Sunguya, U Shigemi, M Matsuda, A Hachiya, E Lyamuya, T Ueno
2. 発表標題 Implications of circulating HIV drug resistance mutations in Tanzania's ART program; analysis of virally suppressed, treatment failure and ART naïve subjects.
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Doreen Kamori, Salim Masoud, Godfrey Barabona, Macdonald Mahiti, Bruno Sunguya, Eligius Lyamuya, Takamasa Ueno
2. 発表標題 HIV integrase genotypes circulating in Tanzania: Implication to efficacy of integrase inhibitors containing regimen
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 George Judicate, Godfrey Barabona, Macdonald Mahiti, Salim Masoud, Doreen Kamori, Amina Shaban Mgunya, Takeo Kuwata, Bruno Sunguya, Eligius Lyamuya, Takamasa Ueno
2. 発表標題 Characterization of Currently Circulating HIV-1 Envelope Sequences in Tanzania
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考