

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10600

研究課題名(和文) フィリピンにおけるエイズ発症と流行拡大に影響するHIV流行株増殖能の解析

研究課題名(英文) An analysis of HIV replication competence related to epidemic and disease development

研究代表者

景山 誠二 (KAGEYAMA, Seiji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60252706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の増殖能診断方法の開発を企画した。まず、流行株増殖曲線により株間の増殖能の違いを観察した(Kageyama et al, JIAPAC 2019)。次に、薬剤耐性遺伝子を持たないHIV株であっても増殖能が高いと、抗ウイルス薬の種類により、通常投与量では制御出来ない場合を示した(Hinay et al 投稿予定)。さらに、増殖能診断の開発に向けて責任遺伝子の探索を開始した。増殖能の異なる2株からRT-PCR法によってcDNAを作成、市販のプラスミドと結合した。このプラスミドを末梢血単核細胞に導入し、純系HIV株を作成し診断薬開発に向けた基盤整備の一段階を終えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIV感染症対策の目標は、エイズ発症予防や伝播効率の低下である。血中ウイルス量値が高いと、エイズ発症(重症化)やウイルス伝播(流行)を導きやすい。本プロジェクトでは、「血中ウイルス量を低値に留めるためには、体内の多様な株のうちで、高い増殖能株を優先的に排除すべきである」と考え、感染者体内の構成ウイルス株の「増殖能診断」を目指した。本研究期間に、増殖能の異なる多様な株の存在を確認し、高い増殖能株に対する既存治療薬の抗ウイルス効果の評価、増殖能関連遺伝子同定のための純系ウイルスの作成など、「増殖能診断」に向けた基盤整備の初段階を終えた。

研究成果の概要(英文)：A diagnosis system of growth capability of human immunodeficiency virus (HIV) strains has been developed because growth capability is one of the determinants of prognosis and prevalence. First, a wide variety of growth capability was recognized (Kageyama et al, JIAPAC 2019). Second, it has been recognized that some strains with high growth capability may not be suppressed by therapeutic anti-HIV drugs (Hinay et al, in preparation). Third, the responsible genes for growth capability have been investigated using two strains with different growth capability. Plasmids including complete HIV sequences of these two strains and was transfected into peripheral blood mononuclear cells. Two monoclonal HIV strains have been synthesized and therefore the initial step was done toward a development of the diagnosis system.

研究分野：ウイルス感染症対策

キーワード：HIV エイズ エイズ発症 HIV流行 増殖能 抗HIV薬

1. 研究開始当初の背景

多種類の抗 HIV (Human Immunodeficiency Viruses, ヒト免疫不全ウイルス) 治療薬の開発が成功し、これらの薬剤を数種類併用して服用することにより、HIV 感染症は HIV による死亡を回避できる慢性感染症となっている。さらに、HIV の完全排除が議論されるころまで来た。しかし、現在の医療技術では完全排除は難しく、完全排除の成功に至った明らかな例は無い。

完全排除に次ぐ目標のひとつは、エイズ発症予防及び流行規模の縮小である。血中ウイルス量が高いと、エイズ発症 (重症化) やウイルス伝播 (流行) を導きやすいことが知られ、HIV-RNA 量が主要な臨床マーカーとして用いられてきた。不思議なことに、個体によって HIV-RNA 量は異なる。その原因はウイルスと免疫にあると考えられるが、明らかでは無い。

2. 研究の目的

「血中ウイルス量を低値に留めるためには、体内の多様な株のうちで、高い増殖能株を優先的に排除すべきではないか」との仮説を立て、感染者からウイルスを分離して、その増殖能の違いを明らかにすると共に、血中ウイルス量との比較に着手した。最終的には、感染者個体が保有するウイルス株のうち最もウイルス増殖能の高い株の増殖レベルを知ることのできる簡易診断法の開発を目指している。

3. 研究の方法

フィリピン政府の非連結匿名化を前提にした薬剤耐性検討プロジェクトに帯同し共同研究を行った。患者末梢血液中の HIV-RNA 量はプロジェクト項目を使用し、ウイルス解析には検査後の患者血清・血漿を利用した。健康人末梢血液由来の単核細胞に患者血清・血漿を暴露後 1 か月間継続して培養することにより、HIV を増殖させた。増殖に成功した HIV の pol 遺伝子配列を決定し、系統樹を描画して分離株を相互に比較した。また、同一量の HIV を検査陰性新鮮末梢血液由来の単核細胞に接種して培養を開始し、7 日目まで細胞培養上清中の HIV-RNA 量を測定し増殖曲線を描いた (Kageyama et al, JIAPAC 2019)。

4. 研究成果

一部を論文に発表した (図 1: タイトルと要約)。

Original Article

Intrinsic Replication Competences of HIV Strains After Zidovudine/Lamivudine/ Nevirapine Treatment in the Philippines

Seiji Kageyama, MD, PhD¹, Alfredo Jr. Amolong Hinay¹, Elizabeth Freda Omengan Telan, MD, PhD², Genesis May Jopson Samonte, MD, MSc³, Prisca Susan Agustin Leano², Akeno Tsunek-Tokunaga, PhD¹, and Kyosuke Kanai, PhD¹

Abstract

Although drug-resistant HIV variants are considered to be less fit than drug-susceptible viruses, replication competence of these variants harbored by patients has not yet been elucidated in detail. We herein assessed the replication competence of strains obtained from individuals receiving antiretroviral therapy. Among 11 306 participants in a drug resistance surveillance in the Philippines, 2629 plasma samples were obtained from individuals after a 12-month treatment with zidovudine (ZDV)/lamivudine (3TC)/nevirapine (NVP). The replication competence of HIV isolates was then assessed by reinoculation into seronegative peripheral blood mononuclear cells in the absence of drugs in vitro. The drug resistance rate was estimated to be 9.2%. Drug-resistant strains were still a minority of closely related strains in a phylogenetic cluster. Among the available 295 samples, 37 HIV strains were successfully isolated. Progeny viruses were produced at a wide range (5.1×10^6 to 3.4×10^9 copies/mL) in primary culture of peripheral blood mononuclear cells. The viral yields were higher than the corresponding plasma viral load (1300 to 3.4×10^6 copies/mL) but correlated with those ($r = 0.4$). These results suggest that strains with higher intrinsic replication competence are one of the primary targets of newly selected drugs at the increasing phase of the plasma viral load during antiretroviral therapy.

Keywords

human immunodeficiency virus, antiretroviral agents, microbial cultures, virulence, drug resistance

Journal of the International Association of Providers of AIDS Care
Volume 18: 1-8
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2325958219856579
journals.sagepub.com/home/jia
SAGE

論文中に、使用したウイルスの性質（表 1） 増殖能の異なる多様な HIV 株の存在（図 2） HIV の増殖能と末梢血液中の HIV 量との相関（図 3）について詳細に記載した。

表 1. 検討した患者由来の HIV 株

Table 1. Drug-Resistant Mutations of the Strains with Lower and Higher Replication Competence.

ID	Replication Competence ^a	Plasma Load (Copies/mL)	CD4 T cells (Cells/mm ³)	Samples for Sequencing	Possible Resistance ^b	Drug-Resistant Mutations Related to														
						Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)														
						M41 ^c	K65	D67	K70	L74	Y115	M184	T215	K219	L100	K103	Y181	Y188	G190	M230
DR1606-505	5.1×10^6	2.2×10^5	136	Plasma ^d	3TC, NVP	-	R	-	-	I	F	V	-	-	-	S	-	-	S	-
DR1512-1094	1.2×10^7	1.2×10^5	Not done	Plasma	ZDV, 3TC, NVP	L	-	-	I	-	V	Y	-	-	N	-	-	-	-	
DR1608-962	1.6×10^7	1.8×10^4	Not done	Plasma	3TC, NVP	-	R	-	-	-	-	-	-	I	N	-	-	-	-	
DR1608-697	3.1×10^7	1.5×10^5	Not done	Plasma	NVP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	
DR1505-087	3.4×10^7	4.0×10^5	Not done	Plasma	3TC, NVP	-	R	-	-	-	V	-	-	-	-	C	-	S	-	
Mean	2.0×10^7	1.8×10^5																		
DR1509-477	8.6×10^8	5.2×10^5	<50	Plasma HIV isolate ^e	ZDV, NVP	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	
DR1510-726	9.9×10^8	7.8×10^4	<50	Plasma HIV isolate	ZDV, 3TC, NVP	-	R	-	-	-	V	-	E	-	N	C	-	-	-	
DR1509-292	1.1×10^9	5.5×10^5	<50	Plasma HIV isolate	3TC, NVP	-	R	-	-	-	I	-	-	I	-	-	-	-	L	
DR1606-521	1.2×10^9	1.7×10^6	Not done	Plasma HIV isolate	ZDV, 3TC, NVP	L	R	-	-	-	V	-	E	-	-	-	-	L	A	
DR1606-463	1.3×10^9	4.5×10^5	<50	Plasma HIV isolate	3TC, NVP	L	R	-	-	-	V	-	E	-	-	-	-	L	A	
Mean	1.1×10^9	6.6×10^5																		

Abbreviations: NVP, nevirapine; 3TC, lamivudine; ZDV, zidovudine; L, Leucine; R, Arginine; E, Glutamic acid; F, Phenylalanine; C, Cysteine; A, Alanine; I, Isoleucine; S, Serine; and V, Valine.

^a Assessed by HIV production levels (copies/mL) in a peripheral blood mononuclear cells culture activated by phytohemagglutinin (PHA) for 7 days.

^b Interpreted using Stanford HIV database.

^c Numbering positions in HIV relative to HXB2 (accession no. K03455).

^d Plasma (pre-passage). An HIV-RNA in plasma samples was used for Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the products were subjected to nucleotide sequence determination.

^e HIV isolate (passaged 4 times in 4 weeks): A patient plasma was exposed to anti-HIV-negative PHA-activated peripheral blood mononuclear cells and cultured for 28 days. An HIV-RNA in the culture medium was used for RT-PCR and resultant determination of the HIV-nucleotide sequence.

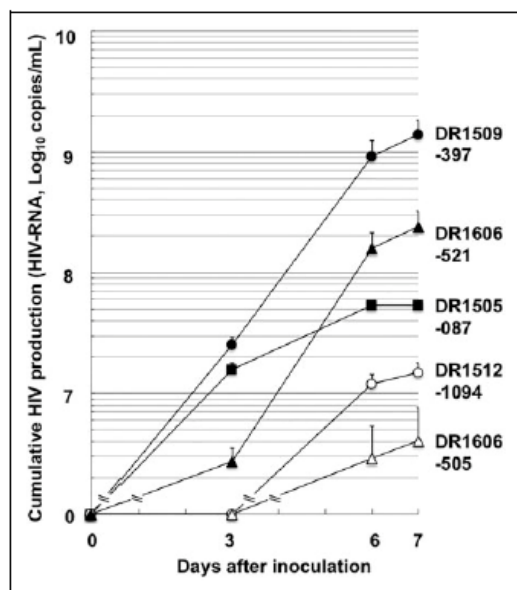


図 2. 患者末梢血液中より得た HIV の増殖能（末梢血液由来単核細胞培養）

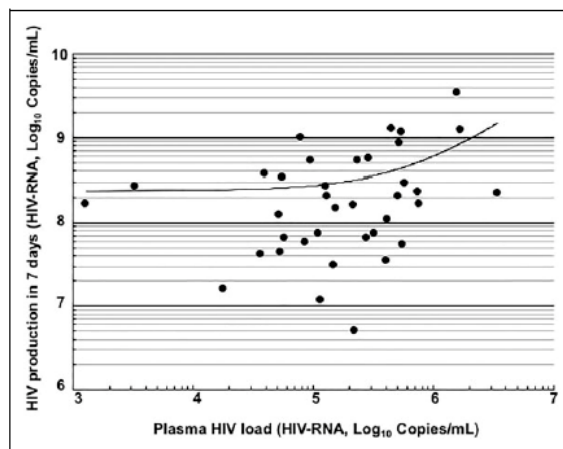


図 3. 患者血漿中の HIV 量と増殖能との関係

上記の結果に続き、高い増殖能株に対する既存治療薬の抗ウイルス効果を評価した。高い増殖能を持つ HIV 株の制御には、血漿中で到達可能な薬物濃度 (Cmin, Cmax) では難しい事例を見いだした (HINAY, A et al. 投稿準備中)。現在使用されている 12 種類の薬剤について、増殖能の異なる 7 株に対する抗ウイルス効果を初代単核細胞培養系で調査した。経口投与の際に達成可能な既知の血中薬剤濃度、Cmin, Cmax と比較したところ、感染制御には Cmax を越える濃度が必要な程に、制御の難しい分離株が存在していた。因みに、対象株は既知の耐性遺伝子をもっていない。12 種のうち 4 種の薬剤については、いくつかの株に対して、完全制御の濃度が Cmin を越えた。この事実は、治療薬処方を選択時に、HIV 株の増殖能診断の必要性を示すものとして注目している (HINAY, A et al. 投稿準備中)。

増殖能診断のためには、遺伝子型と増殖能表現型との関連を検討する必要がある。しかし、感染者から得られた株は複数の純系ウイルスから成る集団であり、性質がどの純系ウイルスに由来するのかが分からない。そこで、患者分離株の「純系 HIV プール」から、単一遺伝子からなる純系 HIV を取り出すことにした。まず、高い増殖能を示す株と、分離株中で最も増殖能の低い株、これら 2 つの株から PCR により全長遺伝子を取り出しプラスミドに繋いで感染性 DNA クローンを作成した。そして、末梢血リンパ球に遺伝子導入して純系ウイルスを作成した。

上記の通り、増殖能の異なる多様な株の存在を確認し、高い増殖能株に対する既存治療薬の抗ウイルス効果の評価、増殖能関連遺伝子同定のための純系ウイルスの作成など、「増殖能診断」に向けた基盤整備の初段階を終えた。今後さらに、「血中ウイルス量を低値に留めるためには、体内の多様な株のうちで、高い増殖能株を優先的に排除すべきである」との仮説を段階的に検証しながら、感染者体内の構成ウイルス株の「増殖能診断」を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kageyama S, Hinay AA, Telan EFO, Samonte GMJ, Leano PSA, Tsuneki-Tokunaga A, and Kanai K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Intrinsic Replication Competences of HIV Strains After Zidovudine/Lamivudine/ Nevirapine Treatment in the Philippines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the International Association of Providers of AIDS Care	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2325958219856579	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学医学部ウイルス学分野 https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3326/23769.html Div. Virol, Faculty of Medicine, Tottori Univ. https://www.med.tottori-u.ac.jp/en/introduction/research/virology.html
--

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
連携研究者	金井 亨輔 (KANAI Kyosuke) (20596621)	鳥取大学・医学部・講師 (15101)	
連携研究者	徳永 朱乃 (TOKUNAGA Akeno) (90632901)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィリピン	国立サンラサロ病院	フィリピン保健省		