

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590199

研究課題名(和文) 抗HIV薬剤の組み合わせにおける理論的裏付けのための新たな試み

研究課題名(英文) Establishment of in vitro selection system by multi anti-HIV drugs

研究代表者

原田 恵嘉 (Harada, Shigeyoshi)

国立感染症研究所・その他部局等・主任研究官

研究者番号：30508643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、臨床分離HIVライブラリーを用いた「多剤in vitro耐性誘導」システムを構築することを主目的として行った。その基盤データを収集する過程で、ウイルスエンベロープ蛋白を標的とする阻害剤を中心に、一方の抗HIV剤に対する耐性変異が、他方の抗HIV剤の感受性に寄与する新たな組み合わせを明らかにすることが出来た。他方、樹立した「多剤in vitro耐性誘導」を各阻害剤の組み合わせで行ったところ、耐性獲得の遅延などをはじめとする有用な知見が得られ、耐性機序の理論的裏付けに基づいた新しい薬剤の組み合わせが示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was to develop an in vitro selection system using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by multi anti-HIV drugs. In this study, we determined that (i) the HIV integrase inhibitor raltegravir (RAL)-resistant clone became highly sensitive to the CCR5 antagonist maraviroc (MVC) and (ii) MVC-resistant clone became highly sensitive to the anti-envelope (Env) neutralizing antibodies, respectively. Furthermore, using established this system, it was determined that acquisitions of resistance mutations were significantly decreased during in vitro selection by multi anti-HIV drugs rather than only single drugs. Thus, this novel system is indicated a useful tool for investigating the compatibility of combined anti-retroviral therapy.

研究分野：HIV感染症

キーワード：HIV AIDS 抗HIV療法 薬剤耐性 耐性誘導 臨床分離株

1. 研究開始当初の背景

抗 HIV 療法における最適な薬剤の組み合わせは年々変化し、かつ流動的である。新しいクラスの薬剤をはじめ、新規薬剤が更に加わることが予想されるが、これまでに、薬剤同士の組み合わせに関しては、in vitro のデータを基にした理論的な裏付けは殆どされていない。今後は、in vitro における予測データの重要性がより高まると考えられる。そこで申請者が確立した、現在実際に感染者間で伝搬している臨床分離ウイルスライブラリー（リアルタイムウイルスライブラリー）を用いる in vitro 耐性誘導法を多剤で行えるように発展させて、薬剤の組み合わせの多様化に対応した「多剤 in vitro 耐性誘導システム」を構築し、「新規薬剤同士」または「新規薬剤+旧薬剤」などの各々の組み合わせによる耐性誘導を行い、耐性機序の理論的裏付けに基づいた新しい薬剤の組み合わせを明らかにする。

2. 研究の目的

そこで本研究は、申請者が確立した臨床分離ウイルスライブラリーを用いる in vitro 耐性誘導システムを基に、「多剤 in vitro 耐性誘導」システムを構築し、(1)「新規薬剤同士」または「新規薬剤+旧薬剤」などの各々の組み合わせによる耐性誘導、(2)旧薬剤で耐性化したウイルスを用いて新規薬剤に対する耐性誘導等を行い、耐性機序の理論的裏付けに基づいた新しい薬剤の組み合わせを明らかにする。

3. 研究の方法

1. 「多剤 in vitro 耐性誘導システム」の確立

申請者が樹立してきた広範囲な臨床分離株ライブラリー（リアルタイムウイルスライブラリー）を用いた耐性誘導システムを多剤で行えるように改良進化させて、薬剤の組み合わせの多様化に対応した「多剤 in vitro 耐性誘導」システムを確立した。本システムでは、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 細胞を用いて行った。この細胞株は、代表的な実験室 R5 ウイルス株 (JR-FL, Ba-L 等) および申請者が用いている臨床分離株ライブラリーのいずれのウイルスでも合胞体形成がみられ、顕微鏡下に感染の広がりを確認できるため、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, Harada S, et al., *J. Virol.*, 2010, Yusa K, et al., *J. Biol. Chem.*, 2005)。このため、耐性誘導におけるウイルスの継代時期の特定が簡便であり、感染症例から分離した R5 臨床分離株に関しても、実験室株同様に合胞体形成能を有することが確認されている。こ

のことから先に確立した臨床分離株ライブラリーを用いた単剤の耐性誘導システム同様に、「多剤 in vitro 耐性誘導」システムにも有用であることから使用した。

II. 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および解析

本研究開始前に、約 50 種類の臨床分離株を分離したが、引き続き本邦で伝搬している臨床ウイルスの分離を続け、臨床分離ウイルスライブラリー（リアルタイムウイルスライブラリー）の更なる充実を目指した。本研究では特に、多剤耐性ウイルスや、単独の薬剤に対する耐性を有するウイルスなどを集中的に分離した。具体的には、まず、15 名の薬剤耐性を有する 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した。その培養上清を 0.22 μm のフィルターに通したあと、使用するまで -150 で保存した。得られた各臨床分離株の pol 領域および env 領域のシーケンスを行い、サブタイプ、耐性変異、およびポリモルフィズム等を同定した。得られた各臨床分離株は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、各抗 HIV-1 剤に対する IC₅₀ を細胞傷害性試験の一つである WST-8 アッセイを用いて同定した。

III. 「多剤 in vitro 耐性誘導」解析

In vitro 耐性誘導は 1 パッセージに 7 日程要すること、かつ、各臨床分離株において耐性獲得速度に差が生じることが予想されることから、確立したシステムを用いて「多剤 in vitro 耐性誘導」を行った。そして本耐性誘導で得られる各パッセージウイルスのシーケンス解析により、耐性能付与責任変異部位の特定を行った。また、それぞれの耐性誘導の特徴、薬効の差異などを詳細に調べるためにウイルス学的解析を行い、耐性機序の理論的裏付けに基づいた新しい薬剤の組み合わせを明らかにした。

4. 研究成果

最初に、「多剤 in vitro 耐性誘導システム」の構築を行うため、4 つのリアルタイムウイルスを用いてインテグラーゼ阻害剤ラルテグラビル (RAL) で耐性誘導後、その耐性ウイルスをベースラインとして、CCR5 阻害剤マラビロック (MVC) で耐性誘導を行い、それに伴うインテグラーゼ (IN) やエンベロープ (Env) 領域の変異に対して各薬剤に対する感受性の変化等の解析を行い、「多剤 in vitro 耐性誘導システム」の基盤データを得ることが出来た。また、その成果の一部を学術雑誌に報告することが出来た (*Journal of General Virology*, 94, 933-43, 2013)。

他方、この基盤データを参考に同じリアルタイムウイルスを用いて、薬剤の順序を入

れ替えて、まず MVC 単剤で耐性誘導後、その耐性ウイルスをベースラインとして次に RAL で耐性誘導を行い、先程と同様の解析を行ったところ、MVC に対する in vitro 耐性誘導で得られた MVC 耐性ウイルスが、その後、RAL に対する in vitro 耐性誘導を行うことで、IN 領域だけでなく Env 領域にも変異が加わり、MVC 高度感受性に变化するという興味深いデータが得られた。このことは、本研究目的で記述した、一方の抗 HIV 剤に対する耐性変異が、他方の抗 HIV 剤の感受性に寄与する新たな組み合わせの一例に繋がり、その成果の一部を現在、学術雑誌に投稿準備中である。

この一方の抗 HIV 剤に対する耐性変異が、他方の抗 HIV 剤の感受性に寄与する新たな組み合わせに関しては、MVC および中和抗体の組み合わせでも同様に得ることが出来た。具体的には、リアルタイムウイルスを用いた耐性誘導で得られた MVC に対して高度耐性を付与する Env 領域のアミノ酸変異が、各種抗 Env 中和抗体に対していずれも高度感受性をもたらすことも明らかになった (*Journal of General Virology*, 95, 1816-26, 2014)。また、これら各種変異の MVC 耐性度および中和抗体感受性に関する詳細な解析が完了した (現在投稿中)。

以上の「多剤 in vitro 耐性誘導システム」確立のための基盤データにより、最終的には、フラスコ培養から 12-48 ウェルプレート培養に変更することで、多剤の濃度組み合わせの割合を同時に多種類展開し、至適な濃度増量を効率的に導き出すシステムに改良および樹立することに成功した。そして、構築した本システムにより、先に触れた「CCR5 阻害剤と中和抗体」に加えて、「新規侵入阻害剤と CCR5 阻害剤」および「新規侵入阻害剤と中和抗体」の組み合わせで「多剤 in vitro 耐性誘導」を行い、薬剤の組み合わせにより、単剤による耐性誘導よりも、耐性獲得の遅延等をはじめとする有用な知見が得られた (現在投稿準備中)。

以上、今回樹立した「多剤 in vitro 耐性誘導システム」に対して、今回拡充されたリアルタイムウイルスライブラリーを用いることで、本研究の目的である (1)「新規薬剤同士」または「新規薬剤+旧薬剤」などの各々の組み合わせによる耐性誘導、(2)旧薬剤で耐性化したウイルスを用いて新規薬剤に対する耐性誘導を行い、耐性機序の理論的裏付けに基づいた新しい薬剤の組み合わせが示すことが可能となった。

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)

Kazuhisa Yoshimura †, Shigeyoshi Harada †, Samatchaya Boonchawalit, Yoko Kawanami, and Shuzo Matsushita.

Impact of maraviroc-resistant and low-CCR5- adapted mutations induced by in vitro passage on sensitivity to anti-envelope neutralizing antibodies. *Journal of General Virology*, 査読有, 95, 1816-1826, 2014. doi: 10.1099/vir.0.062885-0. PubMed Journal of General Virology.

† These authors contributed equally to this work.

Chie Hashimoto, Tetsuo Narumi, Hiroyuki Otsuki, Yuki Hirota, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Nami Ohashi, Wataru Nomura, Tomoyuki Miura, Tatsuhiko Igarashi, Shuzo Matsushita, and Hirokazu Tamamura. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 査読有, 21, 7884-7889, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.005>.

Tetsuo Narumi, Hiroshi Arai, Kazuhisa Yoshimura, Shigeyoshi Harada, Yuki Hirota, Nami, Ohashi, Chie Hashimoto, Wataru Nomura, Shuzo Matsushita, and Hirokazu Tamamura. CD4 mimics as HIV entry inhibitors: Lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 査読有, 21, 2518-2526, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.02.04>.

Shigeyoshi Harada, Kazuhisa Yoshimura, Aki Yamaguchi, Samatchaya Boonchawalit, Keisuke Yusa, and Shuzo Matsushita. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences in vitro. *Journal of General Virology*, 査読有, 94, 933-943, 2013. doi: 10.1099/vir.0.047167-0.

[学会発表](計28件)

Shigeyoshi Harada, Yu Irahara, Samatchaya Boonchawalit, Mai Goryo, Hirokazu Tamamura, Tetsuro Matano, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Mutations at the bottom of the Phe43 cavity are responsible for cross-resistance to NBD analogues. 22th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2015), 2015.2.23-26, U.S.A.(Seattle)

原田恵嘉. CD4 類似低分子化合物 (CD4MCs) と gp120. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会, 2014.12.3-5, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).

原田恵嘉, 横山勝, Samatchaya Boonchawalit, 佐藤裕徳, 松下修三, 吉村和久, CD4 類似低分子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性プロファイルと分子動力

学的機構解析. 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会, 2014.11.10-12, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

Shigeyoshi Harada, Masaru Yokoyama, Samatchaya Boonchawalit, Hironori Sato, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Resistance Profile of CD4 Mimic Small Compounds (CD4MCs) and the Structure Analysis by Molecular Dynamic (MD) Simulation. HIV Research for Prevention 2014, 2014.10.28-31, South Africa (Cape Town).

Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Impact of CD4 mimetics-resistant mutations on susceptibilities to anti-Env nMAbs. 21th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2014), 2014.3.3-6, U.S.A. (Boston).

原田 恵嘉, 鳴海 哲夫, Samatchaya Boonchawalit, 玉村啓和, 松下修三, 吉村和久. パルクおよびクローンウイルスを用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する invitro 耐性ウイルス誘導. 第 27 回 日本エイズ学会学術集会・総会, 2013.11.20-22, 市民会館崇城大学ホール (熊本県熊本市).

原田恵嘉, Samatchaya Boonchawalit, 松下修三, 吉村和久. インテグラーゼ阻害剤ラルテグラビルが MVC 耐性 HIV-1 Env 領域に与える影響. 第 61 回 日本ウイルス学会学術集会, 2013.11.10-12, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. Analysis of interaction between gp120 and CD4 mimic small compounds that enhance the activity of anti-HIV neutralizing antibodies. AIDS Vaccine 2013, 2013.10.7-10, Spain (Barcelona).

Shigeyoshi Harada, Samatchaya Boonchawalit, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, and Kazuhisa Yoshimura. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at 3 amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), 2013.3.3-6, U.S.A. (Atlanta).

Shigeyoshi Harada, Hiroshi Arai, Tetsuo Narumi, Hirokazu Tamamura, Shuzo Matsushita, Kazuhisa Yoshimura. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS

Conference, 2012.7.22-28, U.S.A. (Washington, D.C.).

[その他]

<http://www0.nih.go.jp/niid/arc-l1/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原田 恵嘉 (SHIGEYOSHI HARADA)

国立感染症研究所 エイズ研究センター
主任研究官

研究者番号 : 30508643