

第3回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

薬剤耐性 HIV の *in vivo* および *in vitro* における研究*In Vivo and in Vitro* Researches of Drug-resistant HIV

瀧 永 博 之

Hiroyuki GATANAGA

国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター

AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan

日本エイズ学会誌 5 : 182-187, 2003

はじめに

筆者が行ってきた薬剤耐性 HIV の研究について、中枢神経系、治療効果との関係、新規のアミノ酸変異、の3つに分けて概説する。

1. 中枢神経系における耐性 HIV の動態

HIV は感染の初期から中枢神経に進入し、脳内の主にマイクログリアに感染し、また、無症候期においても、髄液から HIV を分離できることが知られている¹⁻³⁾。中枢神経は、抗 HIV 薬が到達しにくい部位として重要であり、また、HIV 感染症の末期に AIDS 脳症が起こることからも重要な部位といえる。中枢神経とそれ以外の部位で、HIV の薬剤耐性の獲得が異なるのかどうか、ウイルス学的にも、臨床的にも、興味深いところである。

筆者らは、AZT 内服歴のある4人の HIV 感染者の剖検時に得られた脳と脾臓から、DNA を抽出し、HIV プロウイルス DNA の逆転写酵素遺伝子を PCR にて増幅し、クローニングした後、シーケンスを解析した⁴⁾。症例1においては、大部分の脳(10/12)と脾臓(7/11)のクローンが3つの AZT 耐性変異 (M41L, D67N, T215Y) を持っていた(表1)。症例2においては、脳由来の全てのクローンが T215Y を持っていたが、脾臓由来のクローンは持っておらず、過半数のクローン(6/11)は T215D を持っていた。T215D は比較的稀な変異で⁵⁾、Y (TAC) から1塩基置換で変異したものと思われる (D(GAC) に変異するためには、T(ACC) からは2塩基置換が必要)。この変異は、AZT の休薬中に血液中で起こり、中枢神経内には移行していないのであろう。このことから、中枢神経内と血液中では、HIV がある程度独立して、それぞれの進化を遂げて

著者連絡先：瀧永博之 (〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1
国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター)

Fax : 03-3208-4244

2003年5月14日受付

いることが推察される。症例3においては、脳由来の全クローンは M41L と T215Y を持つ同一のパターンを示したが、脾臓由来のクローンでは半分のみがこのパターンを示した。残りのクローンはコドン 215 に S(TCC), N(AAC), や C(TGC) を持っていた。これらの変異も AZT 休薬中に Y(TAC) から変異したと思われる。症例4は興味深いパターンを示していた。脾臓由来のクローンは全て3個以上の AZT 耐性変異を持っていたが、脳由来のクローンは半分(10/20)が耐性変異を持っていなかった(図1)。この症例の髄液と血清中の HIV-RNA のシーケンスを同様に調べたところ、死亡の2年前には耐性変異は認められず、AZT 治療を開始してから10カ月の時点(死亡より14カ月前)で、M41L, D67N, K70R, T215Y の4つの変異が全クローンに認められた。また、剖検時の髄液からのクローンも同じ4つの変異を持っていた。このことから、脳内の感染細胞のうち、ごくわずかのものが髄液中にウイルス粒子を作り出していることがわかる。また、脳内の感受性プロウイルスは、死亡時より少なくとも14カ月前に感染し、死亡時まで生存したと考えられる。

この解析によって、中枢神経内と血液中では、お互いに比較的独立して、それぞれの HIV の進化が起きていることが示された。また、脳内の感染細胞が極めて長期にわたって生存することが示された。このことは、一旦 HIV に感染した患者体内から、ウイルスとプロウイルスの全てを駆逐することは極めて困難であることを示している。

2. プロテアーゼ阻害薬2剤併用療法の効果と耐性変異の関係

サキナビル (SQV) は、*in vitro* で強力な抗 HIV 活性を示すが⁶⁾、初期に臨床にもたらされた SQV ハードジェルカプセルは経口吸収率が低く⁷⁾、臨床的な効果は限られたものであった。一方、リトナビル (RTV) も強力な抗 HIV 活性を持つが⁸⁾、更に、チトクローム P-450 3A4 を強力に抑制する作用も持つ⁹⁾。チトクローム P-450 3A4 は SQV をすみ

表 1 脳と脾臓のプロウイルスに認められた AZT 耐性を付与する HIV 逆転写酵素のアミノ酸変異

症例	脳						脾臓					
	41	67	70	215	219	割合	41	67	70	215	219	割合
野生型	M	D	K	T	K		M	D	K	T	K	
#1	L	N	K	Y	K	10/12	L	N	K	Y	R	7/11
	L	N	R	Y	K	1/12	L	N	K	T	K	2/11
	L	D	K	Y	K	1/12	L	N	K	N	R	1/11
							L	N	K	T	R	1/11
#2	M	D	K	Y	K	8/8	M	D	K	D	K	6/11
							M	D	K	N	K	4/11
							L	D	K	N	K	1/11
#3	L	D	K	Y	K	20/20	L	D	K	Y	K	5/11
							L	D	K	S	K	3/11
							L	D	N	S	K	1/11
							L	D	K	N	K	1/11
							L	D	K	C	K	1/11
#4	M	D	K	T	K	10/20	L	N	R	Y	K	16/20
	L	D	K	T	K	2/20	L	N	K	Y	K	2/20
	M	D	K	Y	K	2/20	W	N	R	Y	K	1/20
	L	N	R	T	K	2/20	W	N	R	Y	N	1/20
	L	N	R	Y	K	2/20						
	M	N	R	T	K	1/20						
	M	N	R	Y	K	1/20						

4人の HIV 感染者の剖検時に得られた脳と脾臓から、それぞれ 8-20 クローンのシーケンスを解析した。太字は AZT 耐性を付与するアミノ酸変異を示す。

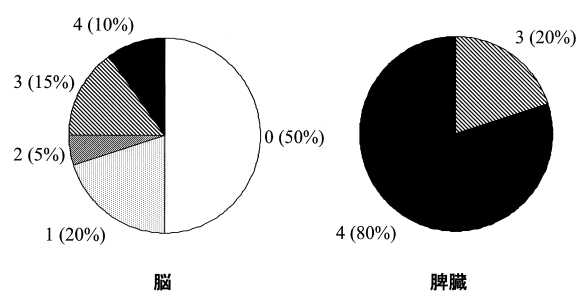


図 1 脳と脾臓のプロウイルスの AZT 耐性変異の違い

症例 4 の剖検時に得られた脳と脾臓から DNA を抽出し HIV の逆転写酵素遺伝子を PCR にて増幅後、20 クローンずつクローニングしてシーケンスを調べた。AZT 耐性変異 (M41L, D67N, K70R, T215Y/F, K219Q) の数とそのクローンの割合をグラフで示した。

やかに代謝するため、RTV によってチトクローム P-450 3A4 を抑制しておけば、SQV の血中濃度は上昇する¹⁰⁾。このことから、SQV と RTV のプロテアーゼ阻害薬 2 剤併用療法は、プロテアーゼ阻害薬を含む多剤併用療法に失敗した後のサルベージ療法としても期待されていた。

筆者らは 3 カ月以上 SQV と RTV の併用療法を受けた 17 人の患者のうち、6 人の有効例と 11 人の無効例について、治療歴、CD4 陽性細胞数、ウイルス量、薬剤血中濃度について比較した。有意差が認められたのは、プロテアーゼ阻害薬による治療歴のみで、有効例では平均 5.5 カ月、無効例では平均 13.9 カ月で有効例に比べて有意に長かった ($p=0.016$)¹¹⁾。また、併用療法導入前の血清が得られた有効例 5 人と無効例 8 人について、HIV プロテアーゼの薬剤耐性変異を調べたところ、無効例に有意に多かった (表 2)。従って、SQV と RTV の併用療法といえども、それ以前に長期間のプロテアーゼ阻害薬による治療歴があると、HIV プロテアーゼに耐性変異が蓄積し、臨床的效果が妨げられる場合があることが明らかとなった。

表 2 プロテアーゼ阻害薬 2 剤併用療法 (RTV+SQV) の有効例と無効例の治療導入前に認められた耐性変異

有効例 (n=5)		無効例 (n=8)	
変異	数	変異	数
(-)	2	(-)	1
(36)	1	(63)	1
(63)	2	(10, 63, 30)	1
		(63, 71, 30, 77, 88)	1
		(10, 46, 63, 90, 77)	1
		(63, 71, 82, 90, 77)	1
		(10, 63, 71, 82, 77)	1
		(10, 46, 63, 71, 84, 90, 77)	1

HIV プロテアーゼに認められた薬剤耐性変異の場所を示した。カッコ内は一人の患者に認められた変異を表し、その症例数も示した。無効例では有効例よりも、多くの耐性変異が認められた (Mann-Whitney ; $p = 0.023$)。

3. プロテアーゼ阻害薬耐性獲得に伴う HIV-1Gag の変異

HIV のプロテアーゼは、そのポリプロテインをそれぞれの機能性の蛋白に分解し、ウイルスを成熟させる役割を持つ。プロテアーゼ阻害薬は、そのプロテアーゼの働きを阻害し、ウイルスの成熟を阻み、新たな細胞への感染を不可能にする。しかし、逆転写酵素阻害薬の場合と同様に、プロテアーゼ阻害薬に対しても HIV は耐性を獲得することができる。プロテアーゼの活性部位付近に、プロテアーゼとその阻害薬の結合を弱めるような変異を起こすと、プロテアーゼ阻害薬耐性の HIV となる。このような変異が、プロテアーゼ阻害薬耐性のプライマリー変異である。プライマリー変異によってもたらされたプロテアーゼの酵素としての活性を補う変異が、セカンダリー変異で、プロテアーゼの活性部位から遠い場所に生じ、プライマリー変異によるプロテアーゼ蛋白のひずみなどを調整すると考えられている¹²⁾。

逆転写酵素の場合と異なり、プロテアーゼ阻害薬の耐性には、もうひとつ異なるメカニズムが明らかにされている。HIV のプロテアーゼはその基質が、HIV 自身のポリプロテインであるため、ポリプロテインのプロテアーゼ以外の部位の変異も、耐性を付与し得ることが明らかとなっている。最初に Doyon らが、Gag のポリプロテイン p7-p1-p6 の切断部位の変異が *in vitro* で起こることを報告し¹³⁾、後に、Zhang らがプロテアーゼ阻害薬を内服している患者でも起こることを報告した¹⁴⁾。p7-p1-p6 の切断は、Gag のポ

リプロテインの切断における律速段階であり¹⁵⁻¹⁷⁾、薬剤耐性 HIV プロテアーゼの一部は、酵素活性が低下し、この切断ができず、そのままでは感染可能なウイルス粒子を構築することができない¹³⁾。そこで、p7-p1-p6 の切断部位に変異が起こることにより、薬剤耐性プロテアーゼにより切断されやすくなると考えられている。

筆者らは、p7-p1-p6 の切断部位以外の変異でも、おそらくポリプロテインの三次構造が変化し、同様にプロテアーゼ阻害薬耐性に寄与している可能性を示した¹⁸⁾。アンプレナビル (APV)、JE-2147、KNI-272、UIC-94003 の 4 種類のプロテアーゼ阻害薬、それぞれの存在下で、耐性 HIV を誘導した。すなわち、HIV-1_{NL4.3} を MT-2 細胞で培養し、徐々に薬剤の濃度を上げて、passage を繰り返した。得られた 4 種類の耐性 HIV のシーケンスを調べたところ、プロテアーゼのみならず Gag にも様々な変異が蓄積していた (表 3)。H219Q は 4 種類 of HIV の全てに認められるが、プロテアーゼ阻害薬非存在下でも出現するため、薬剤耐性とは直接関係が無い可能性がある。A431V と L449F は、既に報告されている p7-p1-p6 の切断部位の変異である^{13,14)} (図 2)。新たに認められた、p7 と p6 の切断部位以外の変異である R409K と E468K について、組換え HIV を作成して、解析した。p1-p6 の切断部位変異である L449F を除いた組換え HIV は全く増殖できなかった (図 3)。E468K を除いた HIV は、APV の存在下でも、非存在下でも、増殖能は低下した。R409K を除いた HIV は APV の存在下で、増殖能が低下した。以上のことから、R409K、L449F、E468K、いずれの gag 変異も、この耐性 HIV の APV 存在下で

表 3 プロテアーゼ阻害薬存在下で誘導された HIV のアミノ酸変異

プロテアーゼ阻害薬	最終濃度 (microM)	passage 数	プロテアーゼに認められたアミノ酸変異
APV	10.0	31	L10F V32I M46I I54M A71V I84V
JE-2147	2.2	33	V32I M46I I47V V82I I84V
KNI-272	4.8	27	V32I M46I A71V V82I I84V
UIC-94003	2.0	62	L10F A28S M46I I50V A71V

プロテアーゼ阻害薬	Gag に認められたアミノ酸変異
APV	E12K V35I L75R H219Q V390D R409K L449F E468K
JE-2147	H219Q V390A R409K L449F
KNI-272	V35I E40K G123E H219Q G381S R409K A431V
UIC-94003	E12K E40K G123E Q199H H219Q R409K G412D L449F E468K

HIV-1_{NL4-3} を徐々にそれぞれの薬剤の濃度を上げながら、MT-2 で passage を繰り返した。最後の濃度と passage 数、ダイレクトシーケンスで認められたアミノ酸変異を示す。

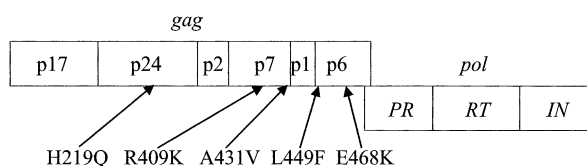


図 2 プロテアーゼ阻害薬耐性にかかわる Gag の変異とその位置

A431V と L449F はそれぞれ、p7-p1, p1-p6 の切断部位に位置するが、R409K と E468K はそれぞれ、p7 と p6 の切断部位以外の場所に位置する。PR : protease, RT : reverse transcriptase, IN : integrase

の増殖を促すことが明らかとなった。

L449F は、感受性 HIV に導入すると増殖能が低下することが報告されている¹³⁾。そこで、R409K と E468K を HIV-1_{NL4-3} に導入し、増殖能を調べた。通常のアッセイでは増殖能の差が明らかではなかったため (図 4 左)、2 つの HIV を混合した後、H9 細胞で passage し、プロウイルスをダイレクトシーケンスで調べ、コドン 409 の R と K、コドン 468 の E と K の比を調べ、2 つの HIV の比率の推移を調べた (Competitive HIV Replication Assay)¹⁹⁾。R409K と E468K を持つ HIV は、徐々にその比率が減少していったことから (図 4 右)、これらの変異は感受性 HIV の増殖をわずかではあるが抑制することがわかった。

これらの解析から、HIV は、プロテアーゼ阻害薬に対する耐性を獲得するために、プロテアーゼと、Gag のポリプロテインの切断部位のみならず、切断部位以外の場所にも変異を生じ、耐性プロテアーゼによって切断されやすいポリプロテインをつくっていることが示唆された。

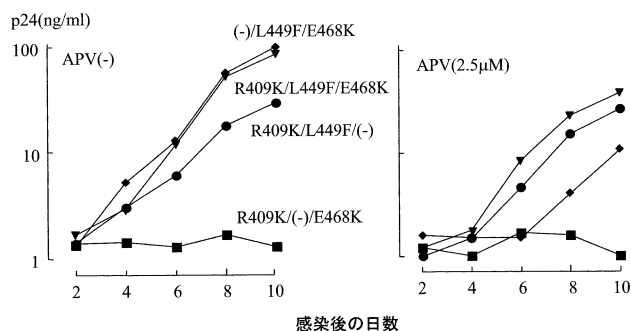


図 3 R409K, L449F, E468K の耐性 HIV の増殖に及ぼす影響

APV に対して誘導された耐性 HIV から、プロテアーゼと p7-p1-p6 を含む HIV プラスミドを作成。更に、gag の R409K, L449F, E468K のそれぞれの変異を野生型に戻して組換え HIV を作成した。それぞれの HIV はプロテアーゼに L10F, V32I, M46I, I54M, A71V, I84V の変異を持つ。APV 存在下と非存在下で増殖能を調べた。APV : アンブレナビル, ▼ : R409K, L449F, E468K を持つ APV 耐性 HIV, ◆ : L449F と E468K を持つ APV 耐性 HIV, ● : R409K と L449F を持つ APV 耐性 HIV, ■ : R409K と E468K を持つ APV 耐性 HIV。

終わりに

現在では多剤併用療法が可能となり、耐性変異出現の頻度はかつてより小さくはなったが、それでもなお、一部の患者には耐性 HIV が出現し、治療の大きな妨げとなっている。今後の研究の進展によって、耐性 HIV の克服が可能となることを期待したい。

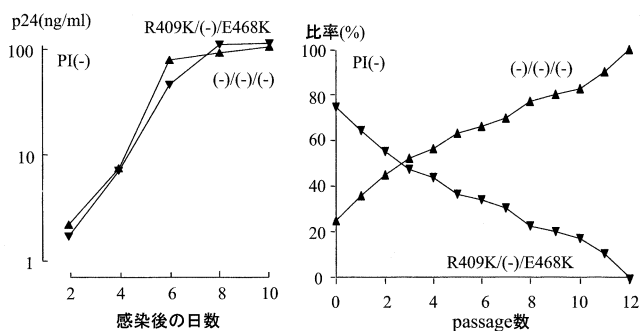


図 4 R409K, E468K の感受性 HIV の増殖に及ぼす影響

プロテアーゼ感受性である HIV-1_{NL4.3} に、gag の変異である R409K と E468K を導入して、組換え HIV を作成した。通常の方法では、増殖能の差が明らかでなかったため (左グラフ)、2 つの HIV を混合し、H9 細胞で passage しながら、比率の推移をシーケンスのエレクトログラムのピークの比で追った (右グラフ)。▲ : HIV-1_{NL4.3}, ▼ : R409K と E468K を導入した HIV-1_{NL4.3o}

謝辞 : このたびは ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞させていただき、ありがとうございました。この場をお借りしまして、今まで御指導いただきました先生方、受賞選考に関係された先生方に、厚く御礼申し上げます。今後も臨床と研究の場で、患者さんの診療に役立つものを手探りしていきたいと思っております。

文 献

- 1) Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauch AS : Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233 : 1089-1093, 1986.
- 2) Watkins BA, Dom HH, Kelly WB, Armstrong RC, Potts BJ, Michaels F, Kufta CV, Dubois-Dalcq M : Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. *Science* 249 : 549-553, 1990.
- 3) Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MBA : Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immunodeficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 7089-7097, 1986.
- 4) Gatanaga H, Oka S, Ida S, Wakabayashi T, Shioda T, Iwamoto A : Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. *Arch Virol* 144 : 29-43, 1999.
- 5) Najera I, Holguin A, Quifinones-Mateu ME, Munoz-Fernandez MA, Najera R, Lopez-Galindez C, Domingo E : pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus : mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 69 : 23-31, 1995.
- 6) Craig JC, Duncan IB, Hockley D, Grief C, Roberts NA, Mills JS : Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Res* 16 : 295-305, 1991.
- 7) Kitchen VS, Skinner C, Ariyoshi K, Lane EA, Duncan IB, Burckhardt J, Burger HU, Bragman K, Pinching AJ, Weber JN : Safety and activity of saquinavir in HIV infection. *Lancet* 345 : 952-955, 1995.
- 8) Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge CA, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP : ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 2484-2488, 1995.
- 9) Kumar GN, Rodrigues AD, Buko AM, Denissen JF : Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277 : 423-431, 1996.
- 10) Merry C, Barry MG, Mulcahy F, Ryan M, Heavey J, Tjia JF, Gibbons SE, Breckenridge AM, Back DJ : Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with zidovudine in HIV-infected patients. *AIDS* 11 : F29-33, 1997.
- 11) Gatanaga H, Aizawa S, Kikuchi Y, Tachikawa N, Genka I, Yoshizawa S, Yamamoto Y, Yasuoka A, Oka S : Anti-HIV effect of saquinavir combined with zidovudine is limited by previous long-term therapy with protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15 : 1493-1498, 1999.
- 12) Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen DM, Richmann DD : Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection : recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 283 : 2417-2426, 2000.
- 13) Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, Lamarre D : Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 70 : 3763-3769, 1996.

- 14) Zhang YM, Imamichi H, Imamichi T, Lane HC, Falloon J, Vasudevachari MB, Salzman NP : Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substitute cleavage sites. *J Virol* 71 : 6662–6670, 1997.
- 15) Darke PL, Nutt RF, Brady SF, Garsky VM, Ciccarone TM, Leu CT, Lumma PK, Freidinger RM, Veber DF, Sigal IS : HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 156 : 297–303, 1988.
- 16) Tozser J, Blaha I, Copeland TD, Wondrak EM, Oroszlan S : Comparison of the HIV-1 and HIV-2 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins. *FEBS Lett* 281 : 77–80, 1991.
- 17) Wondrak EM, Louis JM, de Rocquigny H, Chermann JC, Roques BP : The gag precursor contains a specific HIV-1 protease cleavage site between the NC (P7) and P1 proteins. *FEBS Lett* 333 : 21–24, 1993.
- 18) Gatanaga H, Suzuki Y, Tsang H, Yoshimura K, Kavlick MF, Nagashima K, Gorelick RJ, Mardy S, Tang C, Summers MF, Mitsuya H : Amino acid substitutions in gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem* 277 : 5952–5961, 2002.
- 19) Kosalaraksa P, Kavlick MF, Maroun V, Le R, Mitsuya H : Comparative fitness of multi-dideoxynucleotide-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an in vitro competitive HIV-1 replication assay. *J Virol* 73 : 5356–5363, 1999.