

## 第18回日本エイズ学会シンポジウム記録

### シンポジウム7. 「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」を終えて

杉浦 瓦<sup>1</sup>, 濑永 博之<sup>2</sup>, 田宮 貞宏<sup>3</sup>, 松田 昌和<sup>1</sup>, 松見信太郎<sup>3,4</sup>,  
蜂谷 敦子<sup>2</sup>, John M. Coffin<sup>5</sup>, 満屋 裕明<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> 国立感染症研究所、エイズ研究センター

<sup>2</sup> 国立国際医療センター、エイズ治療・研究開発センター

<sup>3</sup> 熊本大学医学部血液内科学・感染免疫診療部

<sup>4</sup> 米国国立癌研究所内科療法部門レトロウイルス感染症部

<sup>5</sup> HIV Drug Resistance Program, NCI-Frederick

日本エイズ学会誌 7: 180-188, 2005

多剤併用療法が標準的なHIV感染症治療法として行われている今日、治療を適切に進めていく上で薬剤耐性変異の出現を如何に回避するかは重要な研究課題である。また、薬剤耐性HIVについて研究することは治療上の必要性だけでなく、治療薬剤と変異の対応関係の解析によるプロテアーゼおよび逆転写酵素の機能と構造、感染者体内における耐性変異の進化・選択のプロセス、そしてヒトにおけるレトロウイルス感染症の病態などの知見も得ることができる点でも意義の深いことである。第18回日本エイズ学会総会2日目に行われたシンポジウム「薬剤耐性の新知見、基礎から臨床へ」では、米国国立癌研究所 HIV Drug resistance Program の所長 John Coffin 博士を基調講演者として迎え、3人の日本人研究者とともに薬剤耐性 HIV-1 研究の最近の研究成果についての発表と活発な討論が行われた。以下各発表の概要を紹介する。

#### S7-1 「非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine に対する新規耐性変異パターンの解析」

瀬永博之, 蜂谷敦子

国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター

臨床的に広く使われている薬剤耐性検査は genotype assay であるが、この assay は既知の耐性変異の有無で HIV-1 の薬剤耐性を推測する。未知の耐性変異が存在した場合には、まったく無力となるため、 genotype assay をより有効にするためには、新たな薬剤耐性変異の同定・解析が不可欠である。また、 phenotype assay の結果が genotype assay から予想されるものと大きく異なる場合、未知の耐性変異が存在している可能性があり注意を要する。

国立国際医療センターを受診した未治療の HIV-1 感染

著者連絡先：杉浦 瓦（〒208-0011 武藏村山市学園4-7-1  
国立感染症研究所エイズ研究センター）

2005年6月4日受付

患者 44 人から、HIV-1 を分離培養し、MAGIC-5 細胞による phenotype assay を行ったところ、2 株が非核酸系逆転写酵素阻害薬 nevirapine (NVP) に対して高度耐性 (69 倍と 310 倍以上) であった。genotype assay では、既知の NVP 耐性変異は認められなかったが、2 株とも、逆転写酵素の 238 番目のアミノ酸が lysine (K) から serine (S) に変異していた (K238S)。組換え HIV-1 を作成して、増殖能・薬剤感受性を調べたところ、K238S 単独で NVP に対し 4.4 倍耐性となり、既知の NVP 耐性変異と K238S が共存すると、V106A/K238S では 530 倍、V108I/K238S では 56 倍耐性となり、高度な NVP 耐性を獲得することが明らかとなつた<sup>1)</sup>。K238S が genotype assay で認められた場合には、NVP を key drug とする治療法は不適切であると考えられる。近年、非核酸系逆転写酵素阻害薬耐性に関与する 238 番目付近のアミノ酸変異が相次いで報告されており、この領域の polymorphism が治療結果に影響を与える可能性がある。

#### S7-2 「プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性の発現」

松見信太郎<sup>1,2</sup>, 田宮貞宏<sup>2</sup>, 満屋裕明<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学医学部血液内科学・感染免疫診療部

<sup>2</sup> 米国国立癌研究所内科療法部門レトロウイルス感染症部

プロテアーゼ阻害剤 (PIs) の標的である HIV のプロテアーゼは対称的な二量体構造を有し、構造的に微生物のアスパラチルプロテアーゼに類似している。HIV プロテアーゼ阻害剤はこの複合蛋白の切断を阻害し、ウイルス粒子の成熟をブロックすることによって抗ウイルス活性を発揮する。PIs に対する耐性は、主要には、HIV がプロテアーゼの基質結合部位 (あるいはその近傍) にアミノ酸置換を起こして、本来の基質 (ウイルスの前駆体) との親和性を著しく低下させずに、阻害剤との親和性だけを下げることで起る。HIV のプロテアーゼはかなりの可撓性 (flexibility)

を有しており、99 個の構成アミノ酸のうち 60% 以上のアミノ酸に、プロテアーゼとしての酵素活性を保ちながら（減弱は見られるものの）、置換を起こし得る<sup>2)</sup>（図 1）。

耐性株で最初に出現する一群のアミノ酸置換は、投与された阻害剤に特異的なものが多い。こうしたアミノ酸置換は「一次変異」と呼ばれる。「一次変異」はウイルス酵素の構造を変えて阻害剤と酵素の結合が起こらないようにするなどしてウイルスに耐性を付与すると思われるが、その構造変化のために酵素本来の活性が低下して増殖能などが損なわれることが多い。この構造変化を修復、補正するために続いて起こってくる一連のアミノ酸置換が「二次変異」と呼ばれる。複数の「二次変異」が加わってみると、HIV は増殖能を取り戻し、また高度の交差耐性を獲得するようになる<sup>2)</sup>。PIs に対する薬剤耐性の発現には複数のメカニズムが関与している。プロテアーゼと PI の結合という観点から最も重要な機序と考えられるものは、酵素の活性部位にアミノ酸の置換が起こって PI との結合性が失われて（あるいは減弱して）耐性が発現するというものである<sup>2)</sup>。プロテアーゼは構造的に活性中心部位付近に PI の側鎖が入り込んで強固な結合を形成する幾つもの「ポケット（又はサブサイト）」を有している。この酵素はウイルスの基質とも同様な水素結合パターンを形成すると考えられており、それぞれの PI で観察される基質特異性は PI とサブサイトのアミノ酸側鎖との間で形成される結合パターンに依存していると考えられる。このような特異性を規定するサブサイトのアミノ酸に置換が起これば当然その PI に特異的な耐性が発現することになる<sup>2)</sup>。プロテアーゼの活性中心部位でない領域にもアミノ酸の置換が起こって、それが耐性発現に関与することがある。HIV はアミノ酸置換によって PI に対する耐性を獲得するが、その度に本来のプロテアーゼ酵素の活性がしばしば減弱する。これを補うために HIV は、基質である複合蛋白（例えば Gag 蛋白の前駆体部分）の切断部位に突然変異を起こして切断されやすくする等して酵素活性の減弱を代償させ、結果的に酵素活性の損なわれたプロテアーゼによるウイルス蛋白の前駆体（基質）の切断・成熟を進める<sup>3)</sup>。切断部位とは異なった Gag 領域にもアミノ酸置換を起こして viral fitness を維持するメカニズムも確認されている<sup>4)</sup>。極く最近我々は複数のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異株（PIR-HIV）で HIV の Gag 部分の p17/p24 と p1/p6 の切断部位の近傍に「繰返し配列」が集積することを発見した<sup>5)</sup>（図 2）。このような一連の付加アミノ酸（例えば図 2 の HIV-1B 変異株における TGNS）は何れも近傍のアミノ酸配列の繰返し配列で、この「繰返し配列」を野生 HIV 株（HIVWT）に導入すると増殖能が低下したが、full-size の感染性 PIR-HIV クローンを作成してこのクローンから「繰返し配

列」を除くと PIR-HIV クローンの増殖能が低下したことから、この「繰返し配列」は PI に対する耐性を付与する複数のアミノ酸置換のために損なわれたプロテアーゼ活性を代償して酵素による p17/p24 と p1/p6 の切断部位での切断が起こりやすいようにするものと考えられた。ウェスタンプロットで検討すると HIVWT に「繰り返し配列」を導入すると成熟 p24Gag の産生量が著減した。PIR-HIV の増殖速度は HIVWT に比べて遅く、また PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量も HIVWT に比べると少ないが、PIR-HIV から「繰り返し配列」を除くと PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量は更に減少した（図 3）。これらのデータは HIVWT の増殖にとって「繰り返し配列」は不要かつ有害であるが、多剤耐性能を獲得した PIR-HIV にとっては損なわれた変異プロテアーゼの酵素活性を回復するのに必須であることを示すものと思われた<sup>5)</sup>。

### S7-3 「本邦における薬剤耐性 HIV-1 の現状と今後の課題」 松田昌和、杉浦 瓦 国立感染症研究所エイズ研究センター

多剤併用療法が HIV-1 感染症の標準的な治療法として 1997 年に開始されてから今日までの約 7 年間、多数の新薬が登場して HIV-1 感染症を取り巻く治療環境は大きく進歩した。我々は多剤併用療法の導入が HIV-1 の進化・選択にどのような影響を及ぼしてきたのか理解するために（i）既治療感染症例および（ii）新規感染・慢性未治療感染症例という 2 つの異なる集団について解析を行った。解析に用いた HIV-1 の遺伝子領域は治療薬剤の標的である protease および逆転写酵素遺伝子あわせて 1.3Kb である。HIV-1 サブタイプはプロテアーゼ領域あるいは env C2V3 領域 350 bps の系統樹解析により判定をした。既治療症例については国立感染症研究所エイズ研究センターで薬剤耐性遺伝子検査を実施した症例の集団における薬剤耐性出現頻度の年次推移について解析を行った。薬剤耐性変異の判定は IAS-USA の耐性変異リストに準じた。新規感染・慢性未治療症例については、図 4 に示すような遺伝子進化学的な視点から、1997 年と 2003 年の新規・慢性未治療症例各集団内における遺伝子多様性の解析と、1997 年と 2003 年の集団間の多様性のネット変化の算出を行い、抗 HIV-1 治療薬剤の導入がこの 7 年間に HIV-1 に直接的、間接的にどのような影響を及ぼしてきたかについて考察をした。

まず既治療症例における薬剤耐性変異の頻度と推移であるが、ヌクレオシド系およびプロテアーゼ阻害剤耐性変異の頻度は多剤併用療法の導入とともに 1999 年から 2000 年ころまで増加をたどっており、興味深いことにこの 2 クラスの耐性検出頻度はその後横ばいからやや減少に転じてい

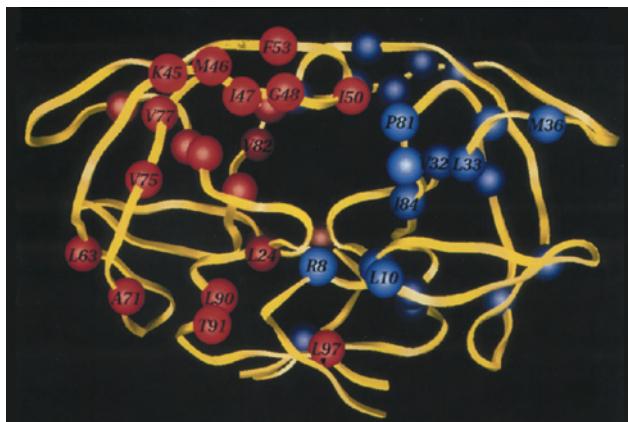


図 1 プロテアーゼ阻害剤に対する薬剤耐性を付与するアミノ酸置換 HIV のプロテアーゼは極めて柔軟性に富んでおり、99 個の構成アミノ酸のうち 60% 以上のアミノ酸に置換を起こして「偽の基質」であるプロテアーゼ阻害剤との結合を回避、正常の基質（ウイルスのポリ蛋白）を認識するようになるとウイルスの複製が再び始まる。これが HIV のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得の主要な機序である<sup>2)</sup>。

HIV-1NL4-3: SKKKAAQQA---AADTGNN---SQVSQNYPIVQ  
HIV-1B: SKKKAAQQA---AADTGNSTGNSSQVSQNYPIVQ  
HIV-1G: S-KKAQQA---AADTGNS---SKVSQNYPIVQ  
HIV-1EV: SKKKAAQQA--AAAADTGNSSQVNSOVSNQNYPIVQ  
HIV-1ES: SKKKAQQAAQQAAADTGSN---SQVSQNYPIVQ

HIV-1NL4-3: HKGRPGNFLQSRPE-----PTAPP---EESFR  
HIV-1B: HKGRPGNFLQSRPE-----PTAPPAPPEESFR  
HIV-1G: HKGRPGNFLQSRPESRPE--PTAPP---EESFR  
HIV-1EV: QKGRPGNFFQSRPE-----PTAPP---EESFR  
HIV-1ES: HKGRPGNLLQSRPEPTAPPAPPTAPP--AESFR

図 2 複数のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性変異株(PIR-HIV)で見られた HIV の Gag 部分での「繰返し配列」PIR-HIV の p17/p24 と p1/p6 の切断部位の近傍で集積して見られたアミノ酸置換（例えば HIV-1B 変異株における TGNS）は何れも近傍のアミノ酸配列の繰返し配列であった。この「繰返し配列」を野生 HIV 株に導入すると増殖能が低下したが、full-size の感染性 PIR-HIV クローンを作成してこのクローンから「繰返し配列」を除くと PIR-HIV クローンの増殖能が低下したことから、この「繰返し配列」は PI に対する耐性を付与する複数のアミノ酸置換のために損なわれたプロテアーゼ活性を代償して酵素による p17/p24 と p1/p6 の切断部位での切断が起こりやすいうようにするものと考えられた。野生株 (HIVWT) のアミノ酸配列は紫、置換アミノ酸は青、「繰返し配列」は赤、鉄型となった元の配列は下線で示す<sup>5)</sup>。

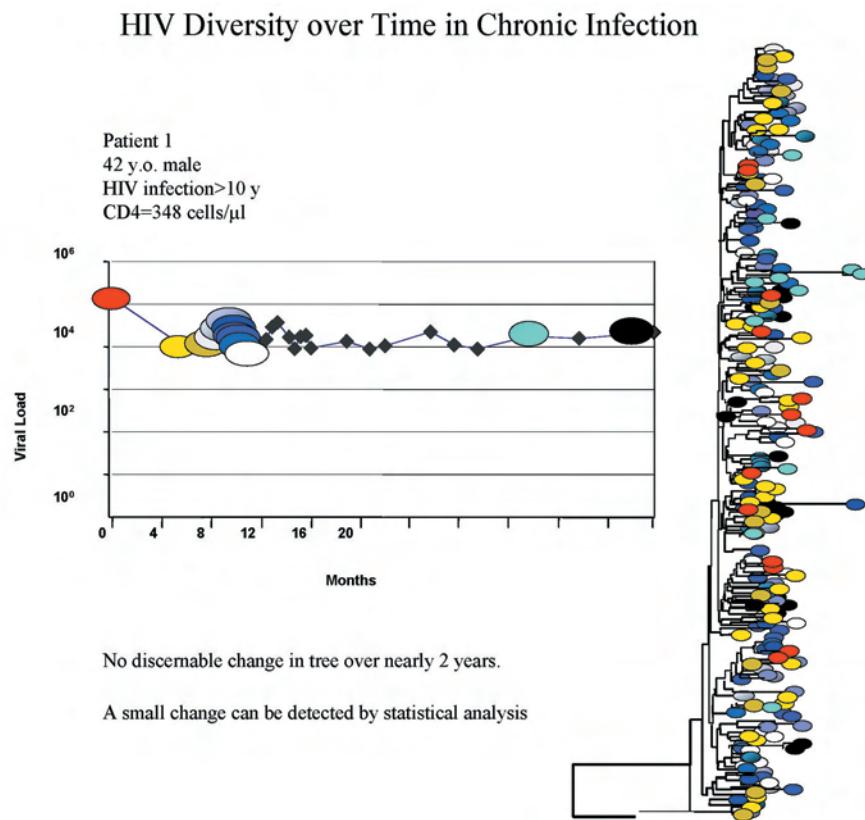


図 8

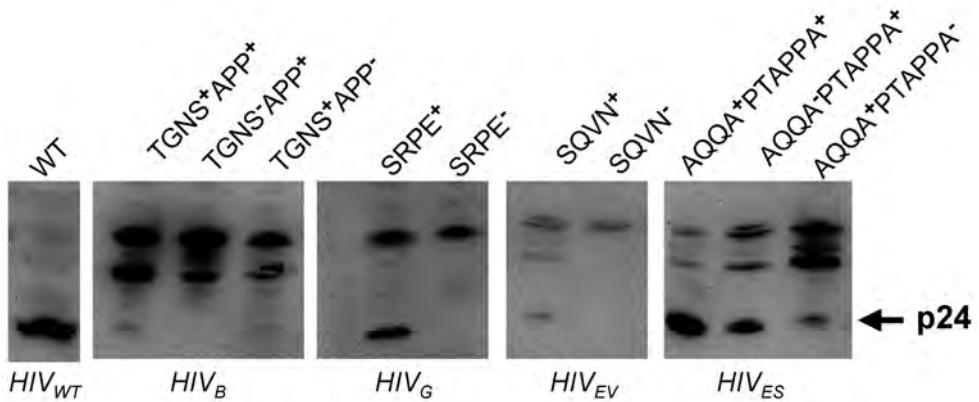


図 3 Gag 部分での「繰り返し配列」は PIR-HIV の増殖能維持に必須である。PIR-HIV の増殖速度は HIVWT に比べて遅く、また PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量も HIVWT に比べると少ないが、PIR-HIV から「繰り返し配列」を除くと PIR-HIV 内の成熟 p24Gag 量は更に減少した<sup>5)</sup>。

#### 1997年と2003年の2つの集団間の遺伝的多様性の比較計算手法

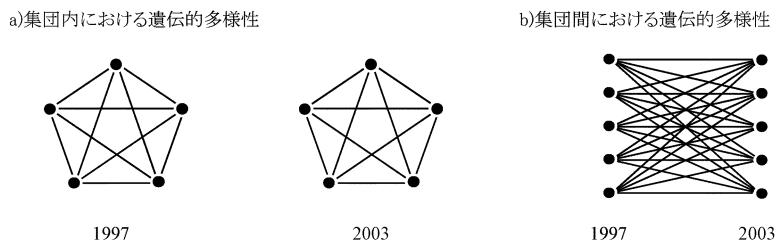


図 4

る。一方、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性変異の検出頻度は 2004 年まで緩やかに増加している。個々の耐性変異毎にその検出頻度を見ると、出現頻度により大まかに高度（20% 以上）、中等度（5-20%）そして低度（5% 未満）の 3 群に分類された。このような耐性変異の出現頻度を左右する因子としては、その時々の処方薬剤のトレンド、変異が耐性に及ぼす影響、変異間の相互作用、そして変異がウイルスの増殖能力に及ぼす酵素化学的および構造的な因子の関与が示唆された。

新規感染・慢性未治療症例における遺伝的多様性の変化は図 5 に示したように、逆転写酵素遺伝子では  $D_{1997} = 0.032 \pm 0.003$  に対し  $D_{2003} = 0.048 \pm 0.004$  と集団における多様性が有意に拡大している。プロテアーゼ遺伝子についても  $D_{1997} = 0.042 \pm 0.005$  に対し  $D_{2003} = 0.055 \pm 0.007$  と多様性の拡大が観察された。この集団内における多様性の拡大は図 5 の無根系統樹の広がりから視覚的にも捕らえることができる。しかしながら 1997 年の症例群と 2004 年症例群の集団間のネット変化については逆転写酵素では 0.002,

プロテアーゼでは  $0.003 \pm 0.001$  にとどまっており、7 年という時間では遺伝子の大きな進化・淘汰は起きてはいないと考えられた。集団間の多様性の拡大については、これが治療薬剤の出現による選択。淘汰の変化なのか、それとも自然界における通常の変化の範疇に収まっているのか、更なる解析と検討が必要であろう。

#### S7-基 “The HIV-Host Interaction : New Insights from New Tools.”

John M. Coffin<sup>1</sup>, Frank Maldarelli<sup>1</sup>, Sarah Palmer<sup>1</sup>, Valerie Boltz<sup>1</sup>, Mary Kearney<sup>1</sup>, Ann Weigand<sup>1</sup>, and John W. Mellors<sup>2</sup>

<sup>1</sup> HIV Drug Resistance Program, NCI-Frederick,

<sup>2</sup> Division of Infectious Disease, University of Pittsburgh.

To obtain more detailed information about the dynamics and evolution of HIV in infected individuals, we have developed 3 assays to detect and quantitate virus and analyze its genetic makeup (図 6)。The first of these, the single copy

## 1997年と2003年の2つの集団の系統樹と多様性

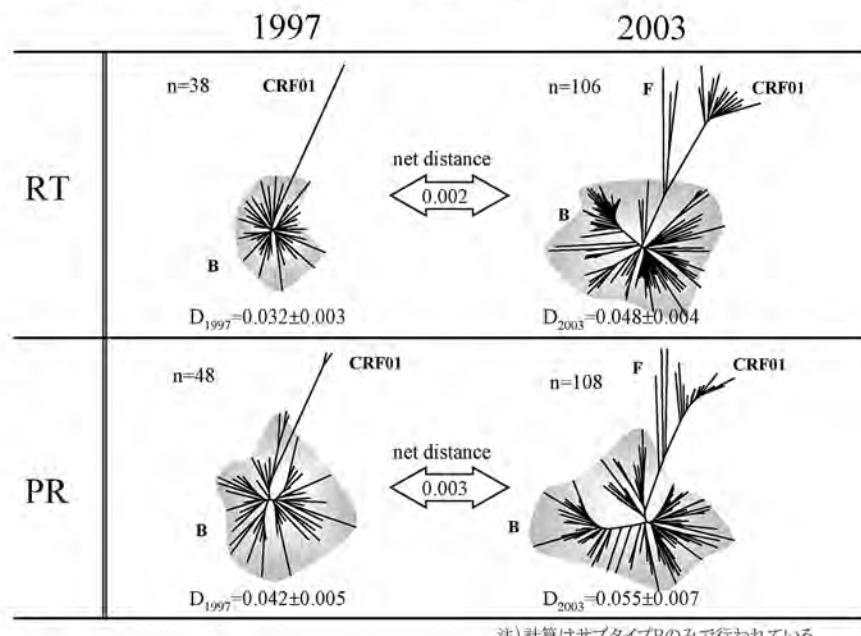


図 5

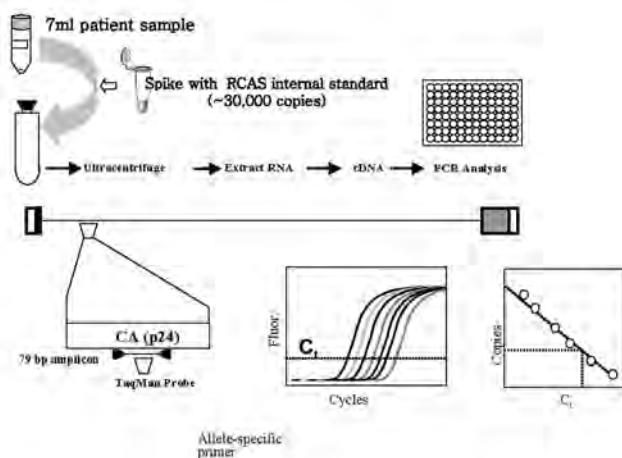
assay (SCA) allows us to detect and accurately quantitate 1 copy of HIV RNA. In routine use, we can measure as little as 0.3 copies of HIV RNA (or 0.15 virions) per ml of patient plasma. The second assay is use of allele-specific PCR (ASP) to detect specific point mutations such as K103N in HIV RT, which confers resistance to NNRTIs. Using ASP, we can detect and quantitate mutations at this codon (AAA to AAT or AAC) comprising less than 0.1% of the total virus population. The third assay is single-genome sequencing (SGS), in which multiple single cDNA molecules derived from reverse transcription of plasma virus are amplified over a region extending from the p6 region of *gag* through most of RT, and sequenced in bulk. This approach allows us to obtain a snapshot of the genetic diversity within the virus population in a single patient at any point in time, with minimal assay based error, and essentially no artifacts due to resampling or assay-based recombination. We have used these assays to study the virus in both naïve and drug-treated patients, with the following results.

1. In a large set of patients with levels of plasma virus that are “undetectable” by standard assays, we find that about 2/3 of them have viremia in the range of 1–20 copies of RNA per ml, with an average around 5 copies/ml. These levels are stable over periods of a year or more (図 7), and are likely to

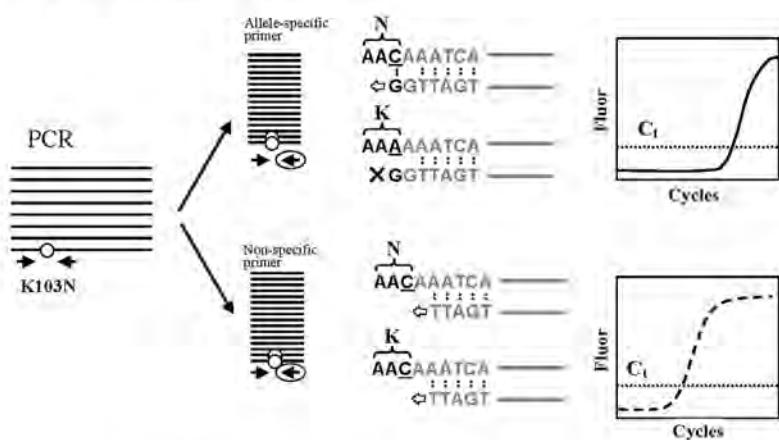
be the source of rebound viremia observed in all patients following interruption of therapy. We do not yet know whether this virus is the result of ongoing low-level replication or is derived from cells infected before initiation of therapy, although preliminary results are consistent with the latter possibility.

2. In individuals who have been infected for long periods of time and remained untreated, the virus has diversified to about 1–2% in the *gag-pol* region, as determined by SGS (図 8). This diversity is remarkably stable so that samples taken years apart can not be distinguished by phylogenetic analysis. Similarly, virus populations retain their diversity through a 100-fold decline in viremia following initiation of therapy. Samples taken soon after infection, by contrast, are usually almost perfectly monomorphic, exhibiting levels of diversity indistinguishable from background up to 70 days after infection. Thus, we can conclude that infection is usually effectively clonal, and the virus population is large and subject to strong purifying selection leading to gradual diversification up to a point where the population is both highly diverse and stably so, although later populations gradually become distinguishable from earlier ones (by subtle statistical tests), there are no significant bottlenecks or episodes of obvious selective sweeps over long periods of time.

### 1) Single Copy Assay



### 2) 103N/K Allele-Specific PCR



### 3) Limiting Dilution PCR Sequencing *AKA: single genome sequencing (SGS)*

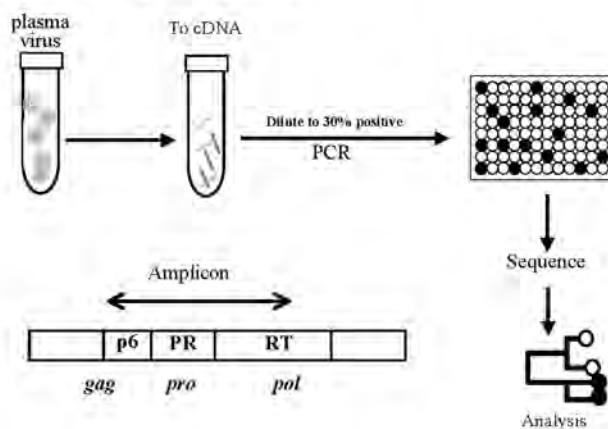


图 6

## Viremia Persists after Suppression by Antiretroviral Therapy

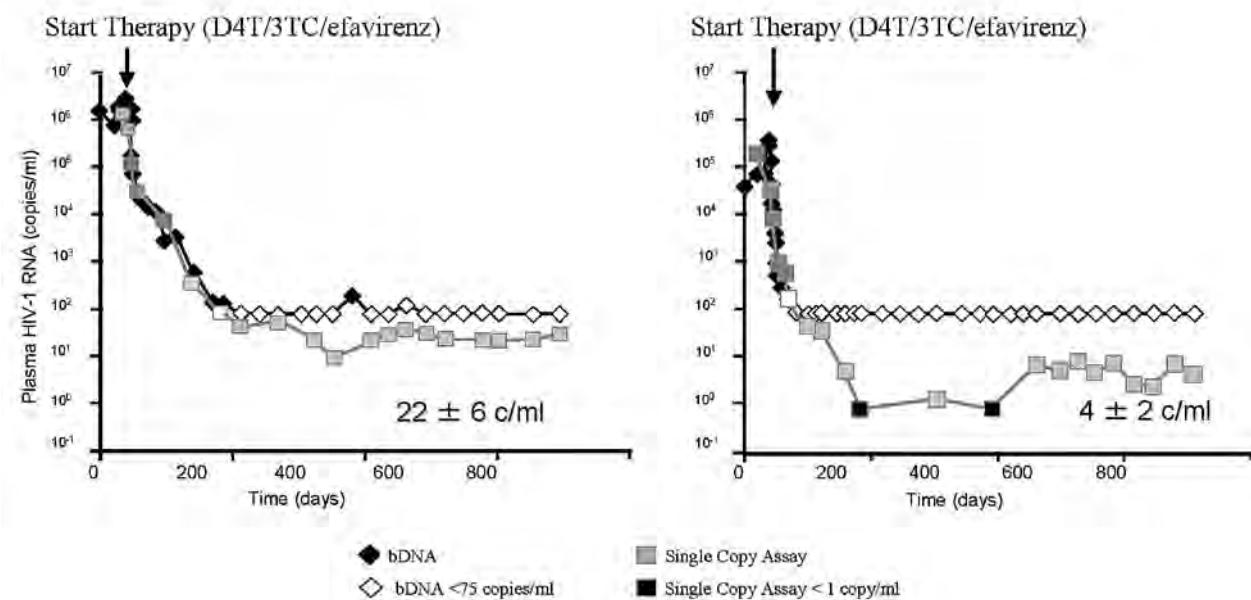


図 7

3. Both theory and experience imply that the virus in individuals who have been infected with HIV for more than a short time should have a low level of preexisting drug resistance mutations. We have therefore used allele-specific PCR to analyze levels of K103N in infected, untreated individuals. The background in the assay was about 0.02%, and the large majority of patient samples gave results very close to this value, implying that the assay is not yet sufficiently sensitive to detect the true values in most patients. A few patients had values significantly larger than background, however, suggesting the possibility of stochastic fluctuations in frequency — such fluctuations — although rare — could have significant implications for the success of subsequent therapy.

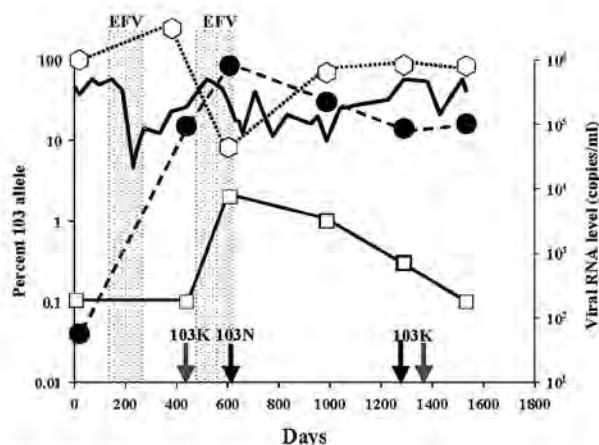
4. In individuals who have failed complex combinations of therapy, including the NNRTI efavirenz (EFV), the K103 N resistance mutation shows a wide variety of behaviors, including persistence at a level of nearly 100% for 5 years after the end of Efv treatment ; rapid reduction to about 10% of the virus population and persistence at that level, and a complete switch in the relevant codon in the virus from AAC to AAT and back again (図 9). Persistence is not due to linkage to other resistance mutations, but the codon switching is the result of linkage to the M184V mutation selected by

treatment with 3TC during part of the Efv therapy.

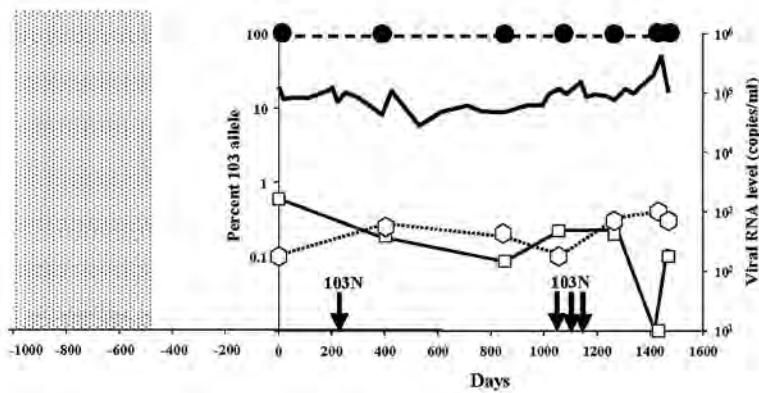
5. In patients who have failed combination antiretroviral therapy, it is standard to test for potentially active drugs by bulk sequence analysis of RT-PCR products derived from plasma virus. To test the ability of standard analysis to detect important resistance mutations, we compared bulk sequences with those of SGS products from plasma virus obtained from highly drug-experienced patients. SGS revealed the presence of resistance mutations that were not detected by standard bulk genotype analysis in 3–20% of genomes analyzed. In some cases, furthermore, the undetected mutations are linked on the same genomes. Since even minor populations of resistant virus are likely to cause rapid failure, bulk sequencing approaches, while useful for predicting resistance to specific drugs, are unlikely to be reliable in predicting sensitivity to them.

Conclusions. The tests we have developed are bringing new insights to the analysis of HIV in infected patients. We have uncovered a new therapeutic steady state viremia in most or all patients that explains our inability to cure the infection. We have found that the genetically highly diverse population of HIV in long-term infected patients is very stable in its diversity. We have learned that standard sequencing ap-

### Patient 1 : Persistent K103N mutation



### Patient 3 : Persistent K103N mutation:



### Patient 5 : 103N codon switch

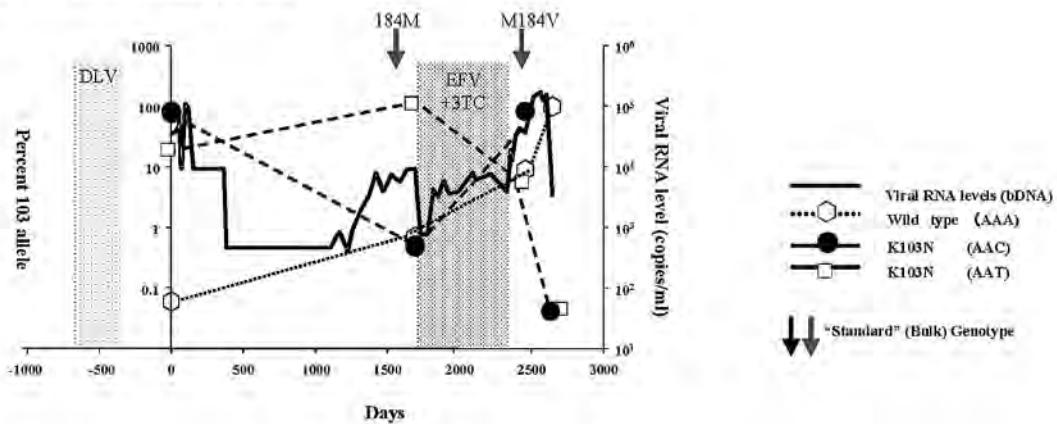


图 9

proaches miss a large fraction of resistance mutations in highly experienced patients, and we have uncovered a puzzling diversity of patterns of loss of drug resistant mutations

long after treatment has ceased. We expect further studies of these phenomena to be equally rewarding in their ability to uncover new aspects of the host-virus relationship.

## 文 献

- 1) Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S : Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naïve patients. *Virology* 327 : 215–224, 2004.
- 2) Mitsuya H, Erickson J : Discovery and development of antiretroviral therapeutics for HIV infection, *In* Merigan TC, Bartlet JG, Bolognesi D eds, Textbook of AIDS Medicine, Williams & Wilkins, Baltimore, p 751–p 780, 1999.
- 3) Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, Lamarre D : Second locus involved in human immuno-deficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* 70 : 3763–3769, 1996.
- 4) 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.
- 5) Tamiya S, Mardy S, Kavlick MF, Yoshimura K, Mistuya H : Amino acid insertions near Gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol* 78 : 12030–12040, 2004.