

原 著

未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異が
efavirenz 耐性誘導に及ぼす影響森 治代¹⁾, 小島 洋子¹⁾, 川畑 拓也¹⁾, 後藤 哲志²⁾¹⁾ 大阪府立公衆衛生研究所感染症部²⁾ 大阪市立総合医療センター感染症センター

目的: Polymorphism として存在する V108I 変異が EFV 耐性獲得に及ぼす影響を検討する目的で、未治療感染者から分離された RT 領域に V108V/I 変異を持つ HIV-1 KK141 株を用いて EFV 耐性ウイルスの誘導を試みた。

方法: KK141 株を PBMC に感染させ、培養液中の EFV 濃度を徐々に上げながら培養した。RT-PCR およびシーケンスにより耐性ウイルスの出現を確認し、MAGIC5 アッセイにより EFV 感受性を調べた。

結果: EFV 存在下で KK141 株の感染・培養を行ったところ、V108I が優位に増殖し軽度耐性を示したが、新たな耐性変異の出現は認められず、EFV 濃度上昇に伴いウイルスは検出されなくなった。ところが、108I ウイルスをさらに EFV 非存在下で培養したところ、V108I に加えて A62V 変異を持つウイルスの増殖が認められ、この A62V/V108I ウイルスを再び EFV 存在下で培養したところ、K103N または L100I 変異が出現し耐性度が上昇した。一方、KK141 株を EFV 非存在下で感染させた後に EFV を添加し培養したところ、野生型の 108V を持つウイルスのみに耐性変異が蓄積し高度耐性を獲得した。

結論: V108I 変異はそれのみでは EFV 高度耐性の誘導に大きな影響を及ぼさないが、A62V 等の変異が共存することにより、薬剤存在下での耐性変異の導入に係わる可能性が示された。

キーワード: HIV, polymorphism, V108I, エファビレンツ, 薬剤耐性変異

日本エイズ学会誌 10 : 184-190, 2008

緒 言

抗 HIV 薬の普及に伴い、既治療患者から新規感染者への薬剤耐性 HIV の感染拡大が HIV 治療における新たな問題として注目されるようになり、世界各国で新規感染者における耐性変異 HIV 保有状況の調査が精力的に行われている¹⁻⁵⁾。わが国でも、新規感染者における薬剤耐性 HIV-1 の広がりを把握するため多機関協力による全国規模でのサーベイランスが実施され（厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「薬剤耐性 HIV 発生動向把握のための検査方法・調査体制確立に関する研究」）、2003-2004 年に HIV-1 感染が確認された新規診断症例の約 4% に薬剤耐性変異が検出されたとの報告がなされている⁶⁾。

HIV の遺伝子は多様性に富んでおり、野生型であっても薬剤耐性変異部位に種々のアミノ酸置換、いわゆる polymorphism が観察される^{7,8)}。それらの大部分は薬剤感受性に影響を及ぼさないと考えられているが、実際の治療効果に対する影響については未だ不明な点が多い。HIV-1 の逆

転写酵素 (RT) 領域における V108I 変異は非核酸系 RT 阻害剤 (NNRTIs) に対する耐性変異の一つで、この変異のみでは弱い耐性を示すに過ぎないが、K103N など他の耐性変異と共存することでその耐性度を上昇させることが知られている^{9,10)}。また、V108I 変異は治療歴のない新規診断症例の 0.4-1% 程度に polymorphism として認められる¹¹⁻¹³⁾。

本研究では、未治療 HIV-1 感染者より分離された RT 領域に V108I 変異を持つ臨床 HIV-1 株を用いて、V108I 変異が NNRTI である efavirenz (EFV) に対する薬剤耐性獲得に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

(1) ウイルス

治療前の薬剤耐性遺伝子検査において RT 領域の 108 番目アミノ酸に野生型である Val と耐性型である Ile が混在する (V108VI) HIV-1 が検出された日本人未治療 HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を、既報¹⁴⁾の方法に従って健康人由来 PBMC と共培養することにより、RT 領域に V108VI を有する臨床 HIV-1 KK141 株を分離した。

(2) EFV 耐性 HIV-1 の誘導とアミノ酸変異の解析

健康人由来 PBMC 2×10^6 個に HIV-1 KK141 株 (分離時

著者連絡先: 森 治代 (〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69
大阪府立公衆衛生研究所感染症部)

2008 年 7 月 28 日受付; 2008 年 9 月 19 日受理

の培養上清 50 μ l) を 0.01 μ M 濃度の EFV (ブリストル・マイヤーズスクイブ社より分与) 存在下または非存在下で感染させ、24穴培養プレートにて培養液中の EFV 濃度を 0.01 μ M から徐々に上げながら培養した。週に一度、培養上清から Isogen LS (ニッポンジーン) を用いて RNA を抽出し、上清 5 μ l 相当量の RNA を鋳型として One Step RNA PCR kit (TaKaRa) を用いた RT-PCR により HIV-1 RT 領域を増幅した。RT-PCR のプライマーには RT1L : 5'-ATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT/RT4L : 5'-TACTTC-TGTTAGTGCTTTGGTTCC を用い、反応条件は 50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 30 sec/54 $^{\circ}$ C 30 sec/72 $^{\circ}$ C 1.5 min \times 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 7 min で行った。電気泳動により増幅産物が確認された場合にウイルスの増殖を認めたものとして、培養液中の EFV 濃度を 1.5-2 倍上昇させ培養を続けた。

また、BigDye Terminator Cycle Sequencing kit ver.1.1 (Applied Biosystems) を用いたシーケンスにより増幅産物の塩基配列を決定し、EFV 耐性関連アミノ酸変異の有無を調べた。一部のサンプルについては、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (BioDynamics Lab. Inc.) を用いて TA クローニングを行った。

(3) 薬剤感受性試験

得られた EFV 耐性 HIV-1 について、MAGIC5A 細胞 (国立感染症研究所 巽 正志博士より分与) を用いた phenotype 耐性試験を実施し、EFV に対する耐性度 (fold-resistance) を測定した。MAGIC5A 細胞を、段階希釈した

EFV と 200-300 Blue Focus Unit/well に調整したウイルスと共に 96 穴平底プレートで 48 時間培養した後、X-gal で染色し青く染まった感染細胞を顕微鏡下でカウントし IC₅₀ を算出した。Fold-resistance は、同時に測定した HIV-1 NL 432 株の IC₅₀ を基準として求めた。

結 果

KK141 株を EFV 非存在下で培養すると、耐性型である 108I を持つウイルスは速やかに培養液中から消失し、野生型である 108V ウイルスのみが検出されるようになった (図 1-A)。一方、同じ KK141 株を EFV 存在下で感染・培養すると、EFV 濃度の上昇に伴って耐性型の 108I ウイルスが優勢となり、培養 3 週間後に EFV 濃度が 0.2 μ M に達した時点では 108I がほぼ 100% となった (図 1-B)。5 週間後には新たに L100V を伴った軽度耐性 (fold-resistance : 15.3 倍) を示す L100V/V108I ウイルス (KK141・EFVr 0.5) が得られたが、それ以上培養を続けても新たな変異の出現は見られず、0.5 μ M 以上の濃度ではウイルスの増殖は認められなくなった。

そこで、図 1-B で見られた現象が EFV による選択の結果であることを確認するために、培養 2 週間の KK141・EFVr0.05 および培養 5 週間の KK141・EFVr0.5 をそれぞれ EFV 非存在下でさらに 4 週間培養した。その結果、表 1 に示すとおり KK141・EFVr0.05 は再び 108V が優勢となり、V/I 比は元の KK141 とほぼ同様に戻った (KK141・

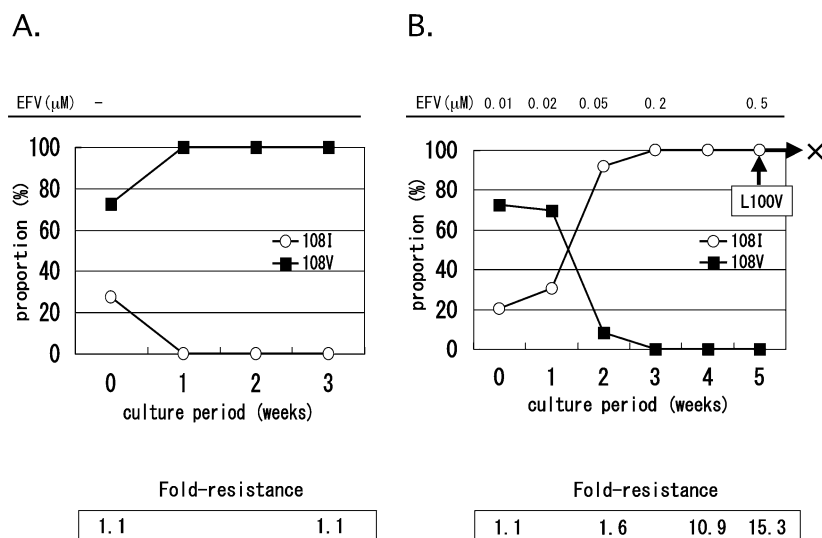


図 1 KK141 株における EFV 耐性変異の誘導

A. KK141 株を EFV 非存在下で PBMC に感染させ、培養した。B. KK141 株を 0.01 μ M EFV 存在下で PBMC に感染させ、EFV 濃度を 0.01 μ M から徐々に上げながら培養した。

RT 領域の 108 番目アミノ酸における I/V 比はシーケンス波形のピーク比から算出した。fold-resistance は各ウイルス株に対する EFV の IC₅₀/NL432 株に対する EFV の IC₅₀ で示した。

EFVr0.05-) ことから, KK141・EFVr0.05に見られた108Iの増殖はEFVにより選択されたものであることが明らかになった。一方, KK141・EFVr0.5に出現したL100V変異は培養液からEFVを除くことにより消失したが, 108Vの再増殖は見られず, 代わりにNRTIsに対する多剤耐性変異の一つとして知られているA62V変異が付加したA62V/V108Iウイルス(KK141・EFVr0.5-)の増殖が認められた。

そこで, このA62V/V108I変異を有するKK141・EFVr0.5-を再度EFVと共に培養したところ, 低濃度のEFV存在下では再びL100V/V108Iの増殖が観察されたが, 培養液中のEFV濃度が0.5μMを超えるとL100V/V108Iは増殖できなくなり, A62V/L100V/V108Iと入れ替わる現象が

認められた。約3ヶ月の培養でNNRTIに対する耐性変異であるK103NまたはL100Iの出現が認められ, fold-resistanceも上昇した。クローニングの結果, これら新たな耐性変異はA62V/V108Iクローンにのみ検出された(表2)。

また, KK141株をEFV非存在下でPBMCに感染させた後にEFV存在下で培養したところ, 108Iウイルスの優位な増殖が認められた。しかしながら, EFV存在下で感染させた場合に比べて108Iが優勢になるまでにより長い培養期間を要し, 108Vウイルスが完全に培養液中から消失する前にK103RおよびY188H変異の出現が観察された(図2)。クローニングの結果, これらの変異は108Iウイルスには認められず, 108Vウイルスのみに検出された。EFVの濃度を上げて培養を続けたところ, 108Iは消失し, K103

表 1 EFVによりKK141株に誘導されるアミノ酸変異

strain	culture weeks	EFV concn (μM) ^a	fold-resistance ^b	mutations	108I clones/total
KK141	0		1.1	V108VI	3/11
KK141・EFVr0.05 ^c	2	0.05	1.6	V108IV	11/12
KK141・EFVr0.2	3	0.2	10.9	V108I	10/10
KK141・EFVr0.5	5	0.5	15.3	L100V, V108I	NT ^e
KK141・EFVr0.05 ^{-d}	+4	0	1.6	V108VI	4/11
KK141・EFVr0.5 ⁻	+4	0	4.7	A62V, V108I	14/14

^a 培養液中のEFV濃度

^b fold-resistance: 各ウイルス株に対するEFVのIC₅₀/NL432に対するEFVのIC₅₀

^c 培養液中のEFV濃度が0.05μMになった時点で増殖してきた耐性ウイルス

^d KK141・EFVr0.05をEFV非存在下で4週間培養して得られたウイルス

^e NT: not tested

表 2 EFVによりKK141・EFVr0.5-株に誘導されるアミノ酸変異

culture weeks	EFV concn (μM) ^a	culture 1			culture 2		
		fold-resistance ^b	mutations	clones	fold-resistance	mutations	clones
0 (KK141・EFVr0.5-) ^c		4.7	A62V, V108I	14	4.7	A62V, V108I	14
5	0.5	5.8	L100V, V108I	6	6.7	L100V, V108I	7
			A62V, L100V, V108I	4		A62V, L100V, V108I	2
			A62V, V108I	1		A62V, V108I	2
			V108I	1			
7	1.0	NT	A62VA, L100V, V108I	NT ^d	9.1	A62VA, L100V, V108I	NT
12	2.0	94.0	A62V, K103N, V108I	6	39.4	A62V, L100V, V108I	6
			A62V, L100V, V108I	4		A62V, L100I, V108I	3

^a 培養液中のEFV濃度

^b fold-resistance: 各ウイルス株に対するEFVのIC₅₀/NL432に対するEFVのIC₅₀

^c KK141・EFVr0.5をEFV非存在下で4週間培養して得られたウイルス

^d NT: not tested

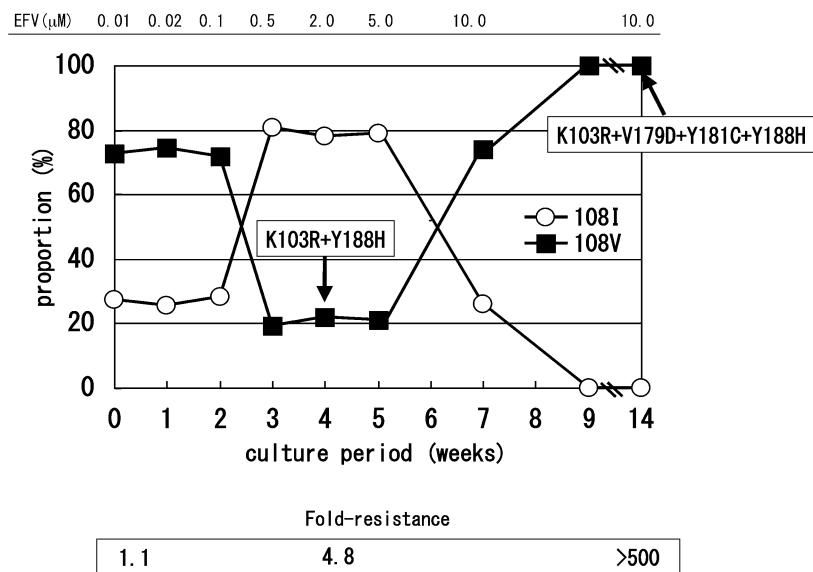


図 2 KK141 株における EFV 耐性変異の誘導

KK141 株を EFV 非存在下で PBMC に感染させた後、EFV 濃度を 0.01 μM から徐々に上げながら培養した。RT 領域の 108 番目アミノ酸における I/V 比はシーケンス波形のピーク比から算出した。fold-resistance は各ウイルス株に対する EFV の IC_{50} /NL432 株に対する EFV の IC_{50} で示した。

R/Y188H 耐性変異ウイルスにはさらに 2 ヶ所 (V179D および Y181C) の変異が蓄積し高度耐性 (fold-resistance : >500 倍) を示した。

KK141 株の RT 領域 (アミノ酸コドン : 1-260) には V108VI 以外の polymorphism として P9PS, K11TK, V35I, K122Q, I135L, S162C, D177E, G196E, T200TI, Q207KQ, R211G (Stanford HIV drug resistance database <http://hivdb.stanford.edu/pages/alg/HIVdb.html> の consensus B との比較による) が存在するが、EFV 耐性誘導培養中にこれらの変異に大きな変化は見られず、また表 2 および図 2 に示した耐性変異以外の新たな変異の出現は認められなかった。

考 察

HIV-1 の RT 領域に polymorphism として存在する V108I 変異が NNRTIs による治療効果に影響を及ぼす可能性を検討する目的で、未治療感染者から分離された V108VI 変異を有する HIV-1 KK141 株を用いて EFV に対する耐性ウイルスの誘導を試みた。

薬剤耐性変異の誘導実験には、継代培養や耐性ウイルス出現の判定が容易な株化 T 細胞と実験室 HIV-1 株が用いられることが多く、Koval らは V108I 変異を導入した NL432 と野生型の NL432 では H9 細胞における増殖力に差がないと報告している¹⁵⁾。我々は、臨床分離株と PBMC の組み合わせでより生体に近い条件で実験を行い、薬剤非存

在下では V108I の増殖力が野生型に劣ることを示した。一方、EFV 存在下では逆に V108I の優位な増殖が認められ、V108I 変異は EFV 存在下でのウイルスの増殖に有利に働くことが推察された。そこで、EFV の濃度を上げながら培養を続けることにより 108I ウイルスに新たな EFV 耐性変異が誘導されると予想されたが、実際には新たな EFV 耐性変異の出現は認められず、108I ウイルスは EFV 濃度 0.5 μM 以上では増殖不可となった。このことから、低濃度の EFV により V108I 変異を持つウイルスが選択され軽度耐性を示すものの、108I ウイルスは増殖力が低く容易には高度耐性獲得に至らないと考えられた。

今回、EFV 添加培養により EFV 耐性変異として報告されていない L100V 変異の出現が観察されたが、この変異の導入による耐性度の変化は 1.5 倍程度であり、EFV 耐性への影響は小さいものと考えられた。V108I と同様に低濃度の EFV により選択されたものと推察されたが、より高濃度の EFV により誘導された K103N は 100V クローンではなく野生型の 100L クローンにのみ検出された。L100I と K103N が共存するとウイルスの増殖力が著しく低下することが知られており¹⁵⁾、L100V の場合も同様に K103N との共存により増殖が困難になるのかもしれない。

他方、EFV を培養液から除くことにより出現した A62V 変異は EFV 耐性獲得に大きく貢献した。A62V は核酸系 RT 阻害剤の多剤耐性に関与する変異であり、それ自身が

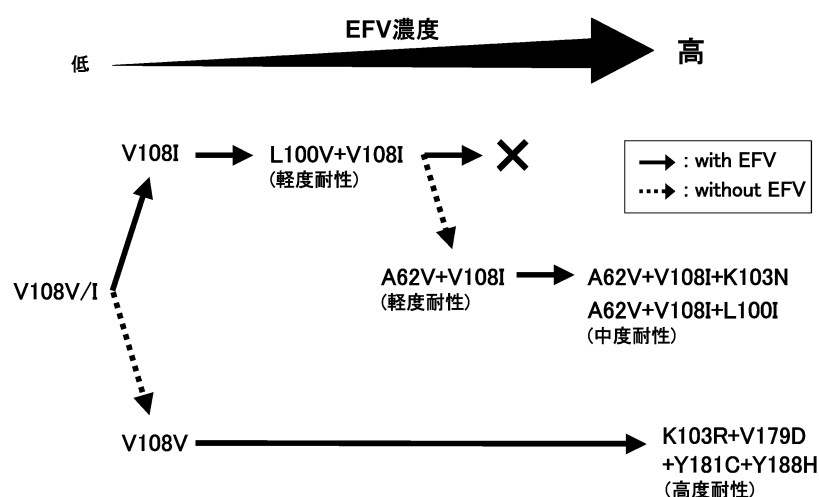


図3 V108V/IからEFV耐性変異が誘導されるまでの流れ

直接的にEFV耐性を付与するものではないが、この変異が導入されたV108Iウイルスは $0.5\ \mu\text{M}$ 濃度以上のEFV存在下での増殖能を回復し、さらなる耐性変異の出現とそれに伴う耐性度の上昇が観察された(表2)。また図2に示されるように、A62Vが共存しない場合、EFV耐性変異は全体の約80%を占める108Iウイルスではなく、EFVにより増殖が抑制されている野生型の108Vにおいてのみ出現した。これらのことから、V108I変異は低濃度のEFV存在下では増殖に有利に働くが、ある程度を越えると増殖できなくなるため、この変異のみを持つウイルスには新たな変異が入りにくく高度耐性には至らないが、A62V変異が薬剤の選択圧下における108Iウイルスの増殖力を高め、新たな変異を入りやすくするのではないかと推察された。本実験より考察されるV108VIウイルスのEFV耐性獲得経路を図3にまとめた。

Loombaらは、エチオピア人から分離されたサブタイプCの臨床HIV-1株を用いたDLV耐性ウイルス誘導実験において、V108I/Y181C変異に引き続きA62Vの出現が認められたと報告している¹⁶⁾。我々が用いたKK141株は日本人男性同性愛者から分離されたサブタイプBであり、エチオピアのサブタイプC株とはRT領域におけるpolymorphismのバックグラウンドが大きく異なるが、どちらも薬剤添加培養前の親株にA62V変異は検出されておらず、NNRTIsによりA62V変異が誘導されたものと考えられる。またA62V以外にも、NRTIs耐性変異であるL74VがEFVを含むHAART施行症例においてL100I+K103Nに伴って観察されたとの報告があり¹⁷⁾、Kovalらはsite-directed mutagenesis法を用いてL100I+K103Nの導入により低下した増殖能をL74Vが回復させることを証明した¹⁵⁾。EFVはNRTIsとのコンビネーション療法において使用頻度の

高い薬剤であり、特にNRTIs長期使用経験者にEFVを処方する際にはNRTIsとNNRTIsの耐性変異の相互作用に注意を払う必要があると考えられる。

本研究により、V108I変異はそれのみではEFV高度耐性の誘導に大きな影響を及ぼさないが、EFV耐性に直接関与しないA62V等の変異が共存することにより、薬剤存在下での耐性変異の導入に係わる可能性が示された。NRTIsに対する多剤耐性関連変異の一つであるA62V変異は、直接EFVの耐性度を上昇させるものではないが、V108Iウイルスの増殖力を高める等の役割によりEFV高度耐性獲得に寄与することが推察された。

謝辞：本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金エイズ対策研究事業「薬剤耐性HIVの動向把握のための調査体制確立及びその対策に関する研究」班の助成を受けて実施した。

文 献

- 1) Shet A, Berry L, Mohri H, Mehndru S, Chung C, Kim A, Jean-Pierre P, Hogan C, Simon V, Boden D, Markowitz M : Tracking the prevalence of transmitted anti-retroviral drug-resistant HIV-1 : a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41 : 439-446, 2006.
- 2) Javaraman GC, Archibald CP, Kim J, Rekart ML, Singh AE, Harmen S, Wood M, Sandstrom P : A population-based approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections : results from the Canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42 : 86-90, 2006.

- 3) Kassu A, Fujino M, Matsuda M, Nishizawa M, Ota F, Sugiura W : Molecular epidemiology of HIV type 1 in treatment-naïve patients in north Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23 : 564–568, 2007.
- 4) UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance ; UK Collaborative HIV Cohort Study ; UK Register of HIV Seroconverters : Evidence of a decline in transmitted HIV-1 drug resistance in the United Kingdom. *AIDS* 21 : 1035–1039, 2007.
- 5) Chang SY, Chen MY, Lee CN, Sun HY, Ko W, Chang SF, Chang KL, Hsieh SM, Sheng WH, Liu WC, Wu CH, Kao CL, Hung CC, Chang SC : Trends of antiretroviral drug resistance in treatment-naïve patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 61 : 689–693, 2008.
- 6) Gatanaga H, Ibe S, Matsuda M, Yoshida S, Asagi T, Kondo M, Sadamasu K, Tsukada H, Masakane A, Mori H, Takata N, Minami R, Tateyama M, Koike T, Itoh T, Imai M, Nagashima M, Gejyo F, Ueda M, Hamaguchi M, Kojima Y, Shirasaka T, Kimura A, Yamamoto M, Fujita J, Oka S, Sugiura W : Drug-Resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antivir Res* 75 : 75–82, 2007.
- 7) Kantor R, Katzenstein D : Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev* 5 : 25–35, 2003.
- 8) Frater AJ, Beardall A, Ariyoshi K, Churchill D, Galpin S, Clarke JR, Weber JN, McClure MO : Impact of Baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients. *AIDS* 15 : 1493–1502, 2001.
- 9) Bacheler LT, Anton ED, Kudish P, Baker D, Bunville J, Krakowski K, Bolling L, Aujay M, Wang XV, Ellis D, Becker MF, Lasut AL, George HJ, Spalding DR, Hollis G, Abremski K : Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 44 : 2475–2484, 2000.
- 10) Bacheler L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, Cordova B, Hertogs K, Larder B, Buckery R, Baker D, Gallagher K, Scarnati H, Tritch R, Rizzo C : Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol* 75 : 4999–5008, 2001.
- 11) Dilernia DA, Lourtau L, Gomez AM, Ebenrstejin J, Toibaro JJ, Bautista CT, Marone R, Carobene M, Pampuro S, Gomez-Carrillo M, Losso MH, Salomon H : Drug-resistance surveillance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 21 : 1355–1360, 2007.
- 12) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD : Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347 : 385–394, 2002.
- 13) Cane P, Chrystie I, Dunn D, Evans B, Geretti AM, Green H, Phillips A, Pillay D, Porter K, Pozniak A, Sabin C, Smit E, Weber J, Zuckerman M ; UK Group on Transmitted HIV Drug Resistance : Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom : multi-centre observational study. *BML* 331 : 1368–1373, 2005.
- 14) 大竹 徹, 森 治代, 森本素子, 上羽 昇, 國田信治, 佐野浩一, 中井益代, 大久保進, 安永幸二郎, 永尾暢夫, 平井健策, 大久保康人 : HIV 抗体陽性者の病態把握のための HIV 分離と臨床マーカーの有用性について. *感染症学雑誌* 64 : 1287–1294, 1990.
- 15) Koval CE, Dykes C, Wang J, Demeter LM : Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1 : Correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N+L100I by the nucleoside resistance mutation L74V. *Virology* 353 : 184–192, 2006.
- 16) Loemba H, Brenner B, Parniak MA, Ma'ayan S, Spira B, Moisi D, Oliveira M, Detorio M, Wainberg MA : Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. *Antimicrob Agents Chemother* 46 : 2087–2094, 2002.
- 17) Ait-Khaled M, Rakik A, Griffin P, Stone C, Richards N, Thomas D, Falloon J, Tisdale M : HIV-1 reverse transcriptase and protease resistance mutations selected during 16–72 weeks of therapy in isolates from antiretroviral therapy-experienced patients receiving abacavir/efavirenz/amprenavir in the CNA2007 study. *Antivir Ther* 8 : 111–120, 2003.

Influence of V108I Mutation Detected in a Treatment-naive HIV-1-infected Patient on the Development of Resistance to Efavirenz

Haruyo MORI¹⁾, Yoko KOJIMA¹⁾, Takuya KAWAHATA¹⁾ and Tetsushi GOTO²⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health

²⁾ Department of Infectious Diseases, Osaka City General Hospital

Background : The aim of this study is to evaluate the influence of a possible polymorphism V108I mutation detected in a treatment-naive HIV-1-infected patient on the evolution of EFV resistance.

Methods : HIV-1 clinical isolate (KK141), carrying V/I mixture at position 108 in the RT region, was obtained from a treatment-naive patient. PBMCs were infected with KK141 in the presence of 0.01 μ M EFV and cultured with 1.5- to 2-fold increasing concentrations of EFV. Emergence of resistance-associated mutations in escaped viruses was monitored by sequence analysis of the RT gene, and drug-susceptibility was determined by MAGIC5 assay.

Results : 108I mutants became predominant by week 3 with modest resistance to EFV, although no additional resistant-mutation was observed, and the virus replication was suppressed in further cultivation with increased concentrations of EFV. Interestingly, when the EFV-selected V108I variant was cultured in the absence of EFV for 4 more weeks, an A62V mutation emerged instead of a re-growth of 108V wild-type virus, and an additional mutation (K103N or V100I) emerged in the A62V/V108I variants when they were cultured with EFV again. On the other hand, when PBMCs were infected with KK141 in the absence of EFV and then cultured in the presence of EFV, highly-resistant variants harboring K103R/V179D/Y181C/Y188H mutations were induced only from the virus with 108V.

Conclusions : The pre-existing V108I mutation detected in a treatment-naive patient is not likely to lead the emergence of highly-resistant variants to EFV. However, the co-existence of A62V, associated with multi-nucleoside resistance, might increase the fitness of V108I variants under the pressure of EFV and enhance the development of resistance.

Key words : HIV, polymorphism, V108I, efavirenz, drug-resistance mutation