

## 原 著

東海地域の HIV-1 感染症例における Lenacapavir  
標的部位の配列保存性に関する研究

後藤 勇也<sup>1,2)</sup>, 澤野 智哉<sup>1,2)</sup>, 重見 麗<sup>2)</sup>, 岡崎 玲子<sup>2)</sup>, 山村 喜美<sup>2)</sup>, 大出 裕高<sup>2)</sup>,  
松田 昌和<sup>2)</sup>, 矢田 啓二<sup>1)</sup>, 今橋 真弓<sup>2)</sup>, 横幕 能行<sup>2)</sup>, 岩谷 靖雅<sup>2,3)</sup>  
(独)国立病院機構名古屋医療センター<sup>1)</sup> 臨床検査科, <sup>2)</sup> 同 臨床研究センター感染・免疫研究部,  
<sup>3)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科免疫不全統御学講座

**目的:** 2022年, HIV-1 カプシド (CA) を標的とする新規作用機序をもつ Lenacapavir (LEN) が多剤耐性 HIV-1 感染者を対象に欧米で認可された。本研究では, 2019~2022年に東海地区のブロック拠点病院・名古屋医療センターを受診した HIV-1 陽性の 228 症例 (うち 210 件は未治療症例) を対象に, LEN の標的である HIV-1 CA 領域の配列保存性を解析し, LEN 導入前の分子疫学的背景となる情報を取得することを目的とした。

**方法・結果:** 該当症例の血漿中ウイルス RNA *gag-PR* 領域を nested RT-PCR 法にて増幅した後, CA 領域の塩基配列をサンガー法にて決定した。決定した配列から, 既報の LEN 耐性関連変異および LEN 結合部位のアミノ酸残基の保存性を解析した。その結果, 耐性関連変異は, サブタイプ C の 1 症例で微小変異として存在した副次変異 K70R のみが検出された。一方, LEN 結合面を形成する部位では, サブタイプ間で異なる出現率を示す多型 (S41T および T54M, Y169F) が高頻度に検出された。立体構造上, これらの多型は LEN 標的部位の辺縁部で生じる変異であった。

**考察:** 当該地域の HIV-1 感染者には LEN 耐性を懸念する変異型 HIV-1 は検出されなかったが, 一方で, 検出された副次変異あるいは辺縁部の多型が LEN 耐性獲得に与える影響について注視する必要があると考えられた。

**キーワード:** HIV-1, Lenacapavir, カプシド, 薬剤耐性, 配列解析

日本エイズ学会誌 25: 129-136, 2023

## 序 文

これまで本邦では HIV-1 感染症治療のため, HIV-1 がコードする酵素 (プロテアーゼおよび逆転写酵素, インテグラーゼ) を標的とする阻害剤が主に使用されてきた。近年では, これら抗 HIV-1 薬剤の改良がすすみ, (i) 阻害作用がより強力かつ耐性ウイルスを出現させにくい, (ii) 食事の影響を受けにくい, (iii) 少ない服薬・投薬回数ですみ, 長期間作用する特徴をもつ薬剤へと改良されてきた。これら抗 HIV-1 薬剤の改良のおかげもあり, 治療を開始した 99% 以上の感染者でウイルス抑制に成功し<sup>1)</sup>, 継続的に服薬・投薬を続けている HIV-1 感染者の余命は, 非感染者と同等にまで改善されたと推定されている<sup>2,3)</sup>。

一方で, 抗 HIV-1 薬剤開発の黎明期から治療を行っている, あるいは不十分な服薬を行っている感染者では, 治療失敗に伴い多剤耐性 HIV-1 が出現した経験があることもあり, 治療の選択肢が限られてしまう問題があった。そのた

め, 新しい作用機序をもつ阻害剤の開発が今日でも続けられている。その例として, HIV-1 カプシド (CA: capsid) コアを標的とした阻害剤, Lenacapavir (LEN; GS-6207) があげられる<sup>4,5)</sup>。LEN は, 本邦では現在未承認であるものの, 2022年8月と12月に欧州と米国で, 多剤耐性 HIV-1 感染者に対する導入用 (lead-in) の経口剤と6か月ごとの投薬が行える長期作用型注射剤の適用が認可された<sup>5~7)</sup>。正常 CA コアは, 約 250 個の CA 六量体と約 12 個の CA 五量体で組み立てられるが<sup>8)</sup>, LEN は CA 六量体の中の CA-CA 界面に結合し, 異常コア構造を誘導することで HIV-1 の複製を阻害する<sup>4)</sup>。また, LEN 標的部位は, プロウイルス DNA の核移行や染色体 DNA へのインテグレーション部位に参与する nucleoporin 153 (NUP153) や cleavage and polyadenylation specific factor 6 (CPSF6) の結合ポケットでもある<sup>9)</sup>。そのため LEN は, それら宿主因子との競合により, 多角的にウイルスの複製を抑制していると考えられている。さらに, LEN 耐性関連変異は NUP153 や CPSF6 との結合にも影響し, ウイルスの複製効率を低下させるため, LEN 耐性 HIV-1 が出現しにくいとも示されている<sup>4,5)</sup>。

本研究は, LEN が未使用である直近の東海地域で流行している HIV-1 について, LEN 標的部位の CA アミノ酸

著者連絡先: 岩谷靖雅 (〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 (独)国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部)

2023年1月6日受付; 2023年4月6日受理

配列の保存性を調査し、東海地域の HIV-1 感染者に対する LEN の有効性についても検討した。

## 方 法

### 1. 臨床検体

2019 年から 2022 年の間に東海地域のブロック拠点病院である名古屋医療センターを受診した HIV-1 陽性者の 228 症例を対象とした。それら症例は薬剤耐性遺伝子検査のため採取した末梢血由来の血漿の残余検体を解析に用いた。228 症例中 210 症例は未治療、12 症例は治療中、6 症例は治療を中断した患者で、LEN 未治療であった。また、ヘルシンキ宣言を遵守し、名古屋医療センター臨床研究審査委員会の承認（承認番号：2010\_310）を受け実施した。

### 2. ウイルス RNA 抽出

EDTA-2K の採血管で採取した HIV-1 感染者の血液から、3,500 rpm、10 分間遠心することで血漿を分離した。この血漿から MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics) あるいは QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen) を用いてウイルス RNA を抽出した。

### 3. 遺伝子増幅

ウイルス RNA の CA 遺伝子領域を以下の方法で増幅した。まず、*gag-PR* 領域の Reverse Transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) には PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara Bio) を用いた。抽出した RNA (2.5  $\mu$ L) と、F.Primer [5'-ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAG (HXB2 参照配列 nt 625-649)] および R.Primer [5'-TATGG-ATTTTCAGGCCCAATTTTGA (nt 2716-2691)] を終濃度 0.4  $\mu$ M で添加した。45°C (10 min)  $\rightarrow$  94°C (2 min)  $\rightarrow$  [98°C (10 s)  $\rightarrow$  56°C (10 s)  $\rightarrow$  68°C (45 s)]  $\times$  40 サイクルの条件で増幅した。

次に、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて nested PCR を実施した。F.Primer [5'-CTCTCTCGAC-GCAGGACTCGGCTTG (nt 681-705)] および R.Primer [5'-ACTTTTGGGCCATCCATTCC (nt 2611-2592)] を終濃度 0.4  $\mu$ M で添加し、[98°C (10 s)  $\rightarrow$  58°C (10 s)  $\rightarrow$  68°C (30 s)]  $\times$  30 サイクルの条件で増幅した。反応後の溶液の一部をアガロースゲル電気泳動し、1,900 塩基対の増幅産物を確認した。

### 4. サンガーシーケンス法 (サンガー法)

Nested-PCR 産物をマルチスクリーン HTS PCR96 フィルタープレート (Merck) を用いた限外濾過法によって精製した。CA 遺伝子 (nt 1,186-1,878; 693 bp) 配列はサンガー法によって決定した。プライマーは 5'-CAGCATTATCAGA-AGGAGCCACCCC (nt 1,307-1,331), 5'-GTTCTGCTAT-GTCACTTCCC (nt 1,505-1,485), 5'-ACTCCCTGACATGC-TGTCATCATTTT (nt 1,847-1,822), 5'-ATCAATGAGGAA-

GCTGCAGAATGGG (nt 1,402-1,426) の 4 種を用い、96°C (15 s)  $\rightarrow$  [96°C (10 s)  $\rightarrow$  60°C (50 s)]  $\times$  30 サイクルの条件で増幅した。増幅反応後、BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) で未反応のダイターミネーターを除去したのち、3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) でシーケンシングを行った。得られた塩基配列について SeqScape 4 (Thermo Fisher Scientific) で波形を確認し、さらに MEGA7<sup>10)</sup> にてアミノ酸配列も確認した。配列は波形上のメジャーピークだけでなくマイナーピークも含めて考慮し、すべての可能性があるアミノ酸残基をリストアップした。また、参照配列として、HXB2 (Genbank #K03455) を用いた。

### 5. LEN 耐性関連変異

本研究では、LEN 耐性関連変異を、すでに報告された L56I, M66I, Q67H, K70N, K70S, K70R, N74D, N74S, A105T, T107N とした<sup>4,5,11)</sup>。また、LEN の結合に関連するアミノ酸残基は、CA 六量体と LEN 複合体の結晶構造 (PDB: Protein data bank, #6V2F)<sup>4)</sup> を PyMOL ソフトウェア (Schrödinger) により解析し、LEN から 4 Å 以内位置するアミノ酸残基を抽出した。

### 6. 系統樹解析

CA 領域のコンセンサス配列をもとに MEGA7<sup>10)</sup> で系統樹を作成しサブタイプを決定した。系統樹作成の際には、Los Alamos HIV Sequence database (<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>) に登録されているサブタイプ参照配列も組み込んだ。なお、系統樹作成は Maximum Likelihood method, Bootstrap method  $\times$  1,000, General Time Reversible model, Gamma distributed with Invariant sites (G+I), Complete deletion, Nearest-Neighbor-Interchange (NNI), Make initial tree automatically (Default-NJ/BioNJ) の条件で行った。

### 7. データベース登録配列解析

Los Alamos HIV Sequence database の HIV Sequence Alignments (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) から配列を抽出し解析に用いた。Alignment type として "Super filtered web", Subtype は "All", Year を "2020" として設定し、Gag 領域のアミノ酸配列を取得した。また、本邦から過去に同データベースに登録され、検体採取年が既知のサブタイプ B および CRF01\_AE の HIV-1 の配列を取得し、合わせて解析した。

## 結 果

2019~2022 年に名古屋医療センターを受診した HIV-1 感染者の 228 症例の CA 領域の配列を解析した。増幅した検体のウイルス量は 201~4,480,000 copies/mL (中央値 88,100), CD4+ T-cell counts は 1~1,022/ $\mu$ L (中央値 125) であった。系統樹解析により、サブタイプの割合は、サブタイプ B

82.9% ( $n=189$ ), CRF01\_AE 9.2% ( $n=21$ ), サブタイプ C 3.9% ( $n=9$ ), CRF02\_AG 2.6% ( $n=6$ ), サブタイプ F 0.9% ( $n=2$ ), サブタイプ A 0.4% ( $n=1$ ) であった (図 1)。サブタイプの割合は、過去の本邦での報告<sup>12,13)</sup>とも類似していた。

次に、LEN 標的部位のアミノ酸配列の保存性を調査した。本研究では、CA 六量体-LEN 複合体の結晶構造 (PDB #6V2F)<sup>4)</sup> 上で、LEN から 4 Å 以内に位置している 26 アミノ酸残基 (I37 および P38, S41, Q50, N53, T54, L56, N57, Q63, M66, Q67, L69, K70, I73, N74, A105, G106, T107, Y130,

Y169, L172, R173, Q179, K182, N183, T186) を LEN 標的部位と定義した (図 2)。これら LEN 標的部位の中には、LEN 耐性関連変異 (L56I, M66I, Q67H, K70N, K70S, K70R, N74D, N74S, A105T, T107N)<sup>4,5,11)</sup> が生じる 7 座位すべてが含まれていた。そのため、まず LEN 耐性関連変異の有無を確認したところ、サブタイプ C の 1 症例のみで K70R が微少変異として検出された (表 1)。

次に、LEN 耐性関連変異以外の変異を LEN 標的部位の 26 アミノ酸座位から探索した。それらのうち、18 アミノ酸座位 (N53 および L56, N57, Q63, M66, Q67, L69, K70, I73,

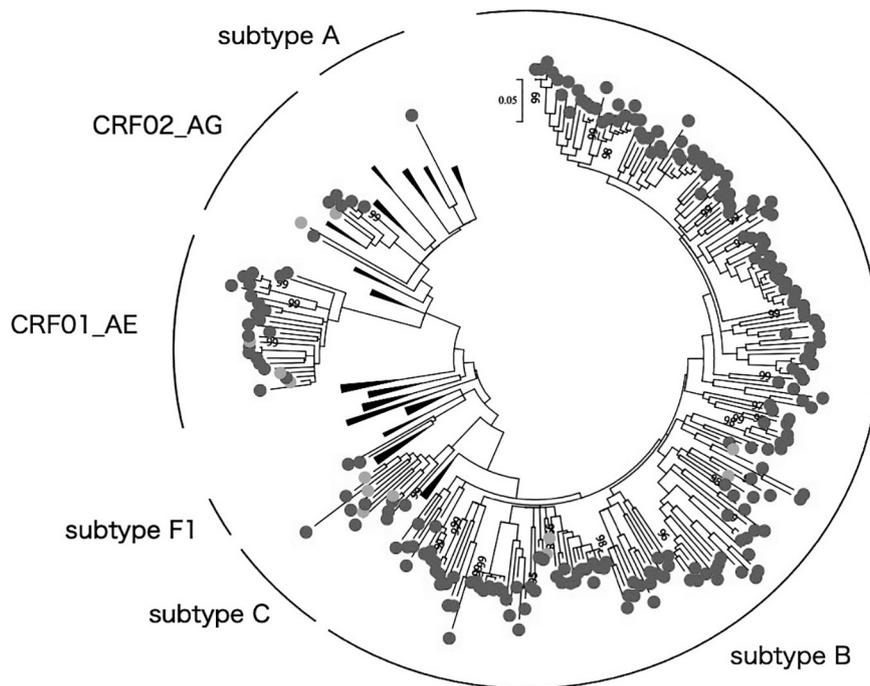


図 1 解析対象 228 症例 CA 領域の系統樹

黒丸を使って本研究で解析した症例をハイライトした。系統樹はサブタイプ参照配列を含めて描かれ、各参照配列と参照配列からなるクラスターをそれぞれ、丸 (灰色) と三角 (黒色) で示す。

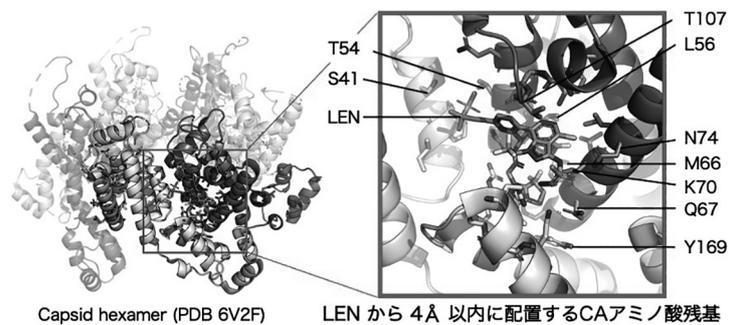


図 2 LEN が結合した HIV-1 CA 六量体分子構造

CA 単量体と LEN はそれぞれリボン表示とスティック表示でハイライトされた。LEN から 4 Å 以内に位置するアミノ酸残基もスティックで示す。

表 1 解析した症例における LEN 標的部位の変異検出数とサブタイプとの関連性

| 変異            | Subtype        |                   |              |                  |              |              | Group M<br>(n = 228) |
|---------------|----------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|--------------|----------------------|
|               | B<br>(n = 189) | 01_AE<br>(n = 21) | C<br>(n = 9) | 02_AG<br>(n = 6) | F<br>(n = 2) | A<br>(n = 1) |                      |
| K70K/R        | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| I37V          | 0              | 1 (4.8)           | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| P38P/S        | 2 (1.1)        | 2 (9.5)           | 0            | 0                | 0            | 0            | 4 (1.8)              |
| P38P/H        | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| S41T          | 84 (44.4)      | 0                 | 8 (88.9)     | 4 (66.7)         | 0            | 0            | 96 (42.1)            |
| S41S/T        | 6 (3.2)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 6 (2.6)              |
| S41A          | 4 (2.1)        | 0                 | 0            | 0                | 1 (50.0)     | 0            | 5 (2.2)              |
| S41V          | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| S41T/A        | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| S41A/S        | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| Q50T          | 3 (1.6)        | 4 (19.0)          | 0            | 0                | 0            | 0            | 7 (3.1)              |
| Q50Q/P        | 0              | 0                 | 0            | 1 (16.7)         | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| Q50G          | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| Q50P/Q/S      | 0              | 0                 | 0            | 1 (16.7)         | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| T54M          | 1 (0.5)        | 21 (100)          | 0            | 4 (66.7)         | 0            | 1 (100)      | 27 (11.8)            |
| T54T/M/I      | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| T54S          | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| T54G          | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| T107A/S       | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| T107A/I/M/T/V | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| Y169F         | 1 (0.5)        | 0                 | 8 (88.9)     | 6 (100)          | 2 (100)      | 1 (100)      | 18 (7.9)             |
| Y169Y/F       | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| N183N/K       | 0              | 0                 | 1 (11.1)     | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| N183T         | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| N183S         | 0              | 1 (4.8)           | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| N183G         | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |
| N183N/H       | 1 (0.5)        | 0                 | 0            | 0                | 0            | 0            | 1 (0.4)              |

括弧内はおのおののサブタイプ別の割合 (%) を示す。

N74, A105, G106, Y130, L172, R173, Q179, K182, T186) には変異は認められなかった。一方で、それ以外の 8 座位 (I37, P38, S41, Q50, T54, T107, Y169, N183) では、微少変異も含めて 0.4~48.2% ( $n=1\sim110$ ) の頻度で変異が認められた。これら変異の中には、LEN 耐性関連変異と同一座位での変異 (T107A/S と T107A/I/M/T/V) がおのおのサブタイプ B とサブタイプ C の 2 症例に含まれていた。なかでも、S41T および T54M, Y169F は、それぞれ 42.1% ( $n=96$ ) および 11.8% ( $n=27$ ), 7.9% ( $n=18$ ) と高い出現率を示した。

これら 3 変異についてさらにサブタイプ別に比較したところ、S41T はサブタイプ B 189 症例中 84 例 (44.4%), サ

ブタイプ C 9 症例中 8 例 (88.9%) で認めた。T54M がサブタイプ B 189 症例中 1 例 (0.5%), CRF01\_AE 21 症例中 21 例 (100%) で認められた。また、Y169F はサブタイプ B の 189 症例中 1 例 (0.5%), CRF01\_AE の 23 症例中 2 例 (8.7%), サブタイプ C の 9 症例中 8 例 (88.9%) で認められた (表 1)。これらの結果から、S41T および T54M, Y169F がサブタイプ間で出現率が異なる多型であることが明らかになった。

## 考 察

本研究では、近年名古屋医療センターを受診した HIV-1

表 2 Loa Alamos HIV 配列データベースに登録された CA 配列の保存性

| アミノ酸座位<br>(HXB2)           | Filtered sequences |                    |                  |                        | 本邦からの登録配列      |                   |
|----------------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------|----------------|-------------------|
|                            | Subtype            |                    |                  | Group M<br>(n = 5,253) | Subtype        |                   |
|                            | B<br>(n = 1,714)   | 01_AE<br>(n = 817) | C<br>(n = 1,104) |                        | B<br>(n = 352) | 01_AE<br>(n = 22) |
| I37                        | 0.6*               | 0.5                | 0.5              | 0.5                    | 0.3            | 0.0               |
| P38                        | 0.2                | 0.2                | 0.4              | 0.2                    | 0.0            | 0.0               |
| S41<br>(S41T) <sup>†</sup> | 26.6<br>(21.4)     | 3.8<br>(3.3)       | 96.6<br>(95.6)   | 38.1<br>(35.6)         | 29.8<br>(27.6) | 0.0               |
| Q50                        | 3.4                | 0.2                | 10.1             | 5.5                    | 2.6            | 0.0               |
| N53                        | 0.1                | 0.0                | 0.3              | 0.1                    | 0.0            | 0.0               |
| T54<br>(T54M)              | 1.8<br>(0.2)       | 98.2<br>(96.9)     | 5.1<br>(0.5)     | 30.2<br>(27.5)         | 0.0            | 100<br>(100)      |
| L56<br>(L56I)              | 0.2<br>(0.06)      | 0.0<br>(0.00)      | 0.5<br>(0.00)    | 0.3<br>(0.02)          | 0.0            | 0.0               |
| N57                        | 0.4                | 0.1                | 0.1              | 0.3                    | 0.0            | 0.0               |
| Q63                        | 0.1                | 0.0                | 0.1              | 0.1                    | 0.0            | 0.0               |
| M66<br>(M66I)              | 0.1<br>(0.06)      | 0.1<br>(0.00)      | 0.0<br>(0.00)    | 0.1<br>(0.06)          | 0.0            | 0.0               |
| Q67<br>(Q67H)              | 0.4<br>(0.12)      | 0.4<br>(0.37)      | 0.1<br>(0.00)    | 0.3<br>(0.10)          | 0.0            | 0.0               |
| L69                        | 0.1                | 0.0                | 0.1              | 0.1                    | 0.3            | 0.0               |
| K70<br>(K70R) <sup>§</sup> | 0.0<br>(0.00)      | 0.4<br>(0.12)      | 0.2<br>(0.09)    | 0.1<br>(0.08)          | 0.0            | 4.6<br>(0.0)      |
| I73                        | 0.1                | 0.0                | 0.0              | 0.1                    | 0.0            | 0.0               |
| N74<br>(N74S) <sup>§</sup> | 0.0<br>(0.00)      | 0.1<br>(0.00)      | 0.1<br>(0.09)    | 0.1<br>(0.02)          | 0.0            | 0.0               |
| A105<br>(A105T)            | 0.2<br>(0.06)      | 0.0<br>(0.00)      | 0.3<br>(0.09)    | 0.2<br>(0.06)          | 0.0            | 0.0               |
| G106                       | 0.1                | 0.0                | 0.4              | 0.2                    | 0.3            | 0.0               |
| T107 <sup>§</sup>          | 2.1                | 2.0                | 1.9              | 1.8                    | 1.4            | 4.6               |
| Y130                       | 0.1                | 0.0                | 0.2              | 0.1                    | 0.0            | 0.0               |
| Y169<br>(Y169F)            | 0.3<br>(0.2)       | 2.2<br>(2.2)       | 99.8<br>(99.8)   | 42.0<br>(41.9)         | 0.0            | 0.0               |
| L172                       | 0.4                | 0.2                | 0.1              | 0.2                    | 0.0            | 0.0               |
| R173                       | 0.1                | 0.0                | 0.5              | 0.2                    | 0.0            | 0.0               |
| Q179                       | 1.1                | 0.2                | 0.5              | 0.6                    | 0.0            | 0.0               |
| K182                       | 0.0                | 0.0                | 0.4              | 0.1                    | 0.0            | 0.0               |
| N183                       | 2.9                | 4.7                | 4.2              | 9.5                    | 1.4            | 4.6               |

\* HXB2 と異なるアミノ酸残基の観察頻度 (%) を示す。

<sup>†</sup> カッコ内には LEN 耐性関連変異あるいは本研究で見つかった 3 多型のデータベース登録配列内の観察頻度 (%) を示す。

<sup>§</sup> LEN 耐性関連変異である K70S および K70N, N74D, T107N は検出されず。

陽性の 228 症例を対象に、LEN 標的部位の CA 配列の保存性を解析した。既知の LEN 耐性関連変異は 1 例のみで、微少変異として検出された。検出された LEN 耐性関連変異 K70R は副次変異として分類され<sup>11)</sup>、主要変異である Q67H

と同時に現れると 15 倍の耐性を示すと報告されている変異である<sup>5)</sup>。しかし、K70R の単独変異では、ウイルスの感染価が約 90% 低下し、HIV-1 の複製には著しく不利な変異であると報告されている<sup>14)</sup>。また、LEN 標的部位の多

型として、S41TがサブタイプBとC、T54MがCRF01\_AE、Y169FがサブタイプCで高頻度に観察された。これら3つのLEN標的部位での多型(S41TおよびT54M、Y169F)は、HIV-1 CA六量体-LEN複合体構造(図2)<sup>4)</sup>を観察すると、LEN標的部位の辺縁部に位置しており、S41およびT54、Y169が水素結合などの強いLENとの結合に関わっていない。さらに、さまざまなサブタイプからなる臨床分離株に対する50%効果濃度(EC<sub>50</sub>: 50% effective concentration)が20~160 pMと低く、サブタイプおよびグループ間でLENの阻害効果は同程度であると報告<sup>4)</sup>されている。そのため、名古屋医療センターで診断された最近の症例に対してLENは有効であると考えられる。今後、異なるサブタイプ間で、LEN耐性の出現しやすさに違いがあるかなどについては、さらに詳細な解析が必要であろう。

本研究で解析されたLENの標的部位のCA配列の保存性は、Los Alamos HIV sequence databaseに登録されたFiltered配列ならびに本邦から登録された2013年以前の検体の配列におけるアミノ酸残基保存性<sup>15)</sup>とも合致する(表2)。これら比較に用いたデータベースの登録配列については、本研究で得られた配列と、検体の採取地域や採取時期、データの抽出方法などの背景が異なり統計学的な比較は困難である。しかし、これらの変異のサブタイプ内での頻度が、配列データセット間で類似していることから、LEN標的部位は経年的にも高い保存性を示すことがうかがえる。LEN標的部位は、HIV-1の複製にも関わる宿主因子NUP153やCPSF6の結合部位と重なることから、これら配列の保存性は宿主因子との相互作用に重要であることに起因すると考えられる。

LENがこれら宿主因子と競合することは、LEN耐性型HIV-1の出現しにくさとも関係していると考えられている。しかし、不適切なLEN錠剤の服薬、あるいはLENと効果が期待できない薬剤を同時服薬・投薬した感染者では、LEN耐性型ウイルスが出現したとの報告もある<sup>5)</sup>。そのため、LENの使用にあたっては、これまでと同様<sup>12,13,16~20)</sup>、遺伝子検査に基づく治療薬選択と服薬指導、ならびにCA遺伝子配列に基づく疫学的調査が重要であると考えられる。

また、LENと同じく長期作用型のCabotegravir + RilpivirinではサブタイプA1/A6が治療失敗に関わるとの報告もあり<sup>21)</sup>、ある種のサブタイプ、あるいは本研究で見つかったようなCA多型や未同定の変異が事前に存在する場合には同じようにLENによる治療失敗に関わる可能性もあるかもしれない。今後、サブタイプあるいは多型・変異と治療失敗の関係性については注意深く追跡する必要があると考えられる。

## 謝辞

本研究の実験や解析に協力していただいた名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部のスタッフの皆様へ深く感謝申し上げます。

**利益相反**：本研究における利益相反に相当する事項はない。

## 文 献

- 1) Iwamoto A, Taira R, Yokomaku Y, Koibuchi T, Rahman M, Izumi Y, Tadokoro K : The HIV care cascade: Japanese perspectives. *PLoS One* 12: e0174360, 2017.
- 2) Nakagawa F, May M, Phillips A : Life expectancy living with HIV: recent estimates and future implications. *Curr Opin Infect Dis* 26 : 17-25, 2013.
- 3) Marcus JL, Leyden WA, Alexeeff SE, Anderson AN, Hechter RC, Hu H, Lam JO, Towner WJ, Yuan Q, Horberg MA, Silverberg MJ : Comparison of overall and comorbidity-free life expectancy between insured adults with and without HIV infection, 2000-2016. *JAMA Netw Open* 3 : e207954, 2020.
- 4) Link JO, Rhee MS, Tse WC, Zheng J, Somoza JR, Rowe W, Begley R, Chiu A, Mulato A, Hansen D, Singer E, Tsai LK, Bam RA, Chou CH, Canales E, Brizgys G, Zhang JR, Li J, Graupe M, Morganelli P, Liu Q, Wu Q, Halcomb RL, Saito RD, Schroeder SD, Lazerwith SE, Bondy S, Jin D, Hung M, Novikov N, Liu X, Villasenor AG, Cannizzaro CE, Hu EY, Anderson RL, Appleby TC, Lu B, Mwangi J, Liclican A, Niedziela-Majka A, Papalia GA, Wong MH, Leavitt SA, Xu Y, Koditek D, Stepan GJ, Yu H, Pagratis N, Clancy S, Ahmadyar S, Cai TZ, Sellers S, Wolckenhauer SA, Ling J, Callebaut C, Margot N, Ram RR, Liu YP, Hyland R, Sinclair GI, Ruane PJ, Crofoot GE, McDonald CK, Brainard DM, Lad L, Swaminathan S, Sundquist WI, Sakowicz R, Chester AE, Lee WE, Daar ES, Yant SR, Cihlar T : Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature* 584 : 614-618, 2020.
- 5) Segal-Maurer S, DeJesus E, Stellbrink HJ, Castagna A, Richmond GJ, Sinclair GI, Siripassorn K, Ruane PJ, Berhe M, Wang H, Margot NA, Dvory-Sobol H, Hyland RH, Brainard DM, Rhee MS, Baeten JM, Molina JM, Investigators CS : Capsid inhibition with lenacapavir in multidrug-resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 386 : 1793-1803, 2022.
- 6) Administration: FUFaD 2022, posting date. FDA Approves New HIV Drug for Adults with Limited Treatment Options. [Online]

- 7) Agency : EEM 2022, posting date. Sunlenca. [Online]
- 8) Zhao G, Perilla JR, Yufenyuy EL, Meng X, Chen B, Ning J, Ahn J, Gronenborn AM, Schulten K, Aiken C, Zhang P : Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* 497 : 643–646, 2013.
- 9) Bhattacharya A, Alam SL, Fricke T, Zadrozny K, Sedzicki J, Taylor AB, Demeler B, Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Diaz-Griffero F, Ivanov DN, Yeager M : Structural basis of HIV-1 capsid recognition by PF74 and CPSF6. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 18625–18630, 2014.
- 10) Kumar S, Stecher G, Tamura K : MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33 : 1870–1874, 2016.
- 11) Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Gunthard HF, Paredes R, Shafer RW, Richman DD : 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 30 : 559–574, 2022.
- 12) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Mori H, Minami R, Uchida K, Sadamasu K, Kondo M, Sugiura W, Japanese Drug Resistance HIVSN : Characteristics of transmitted drug-resistant HIV-1 in recently infected treatment-naive patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr* 71 : 367–373, 2016.
- 13) Shiino T, Hachiya A, Hattori J, Sugiura W, Yoshimura K : Nation-wide viral sequence analysis of HIV-1 subtype B epidemic in 2003–2012 revealed a contribution of men who have sex with men to the transmission cluster formation and growth in Japan. *Front Reprod Health* 2 : 531212, 2020.
- 14) Shi J, Zhou J, Halambage UD, Shah VB, Burse MJ, Wu H, Blair WS, Butler SL, Aiken C : Compensatory substitutions in the HIV-1 capsid reduce the fitness cost associated with resistance to a capsid-targeting small-molecule inhibitor. *J Virol* 89 : 208–219, 2015.
- 15) Troyano-Hernaez P, Reinoso R, Holguin A : HIV capsid protein genetic diversity across HIV-1 variants and impact on new capsid-inhibitor lenacapavir. *Front Microbiol* 13 : 854974, 2022.
- 16) Fujisaki S, Ibe S, Hattori J, Shigemi U, Fujisaki S, Shimizu K, Nakamura K, Yokomaku Y, Mamiya N, Utsumi M, Hamaguchi M, Kaneda T : An 11-year surveillance of HIV type 1 subtypes in Nagoya, Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25 : 15–21, 2009.
- 17) Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, Ibe S, Fujisawa S, Chiba H, Tatsumi M, Kato S, Sugiura W : Japanese external quality assessment program to standardize HIV-1 drug-resistance testing (JEQS2010 program) using in vitro transcribed RNA as reference material. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31 : 318–325, 2015.
- 18) Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, Sadamasu K, Kondo M, Mori H, Ueda M, Tateyama M, Ueda A, Kato S, Ito T, Oie M, Takata N, Hayashida T, Nagashima M, Matsuda M, Ibe S, Ota Y, Sasaki S, Ishigatsubo Y, Tanabe Y, Koga I, Kojima Y, Yamamoto M, Fujita J, Yokomaku Y, Koike T, Shirasaka T, Oka S, Sugiura W : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res* 88 : 72–79, 2010.
- 19) Shiino T, Hattori J, Yokomaku Y, Iwatani Y, Sugiura W, Japanese Drug Resistance HIVSN : Phylodynamic analysis reveals CRF01\_AE dissemination between Japan and neighboring Asian countries and the role of intravenous drug use in transmission. *PLoS One* 9 : e102633, 2014.
- 20) 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. *Antiviral Res* 75 : 75–82, 2007.
- 21) Cutrell AG, Schapiro JM, Perno CF, Kuritzkes DR, Quercia R, Patel P, Polli JW, Dorey D, Wang Y, Wu S, Van Eygen V, Crauwels H, Ford SL, Baker M, Talarico CL, Clair MS, Jeffrey J, White CT, Vanveggel S, Vandermeulen K, Margolis DA, Aboud M, Spreen WR, van Lunzen J : Exploring predictors of HIV-1 virologic failure to long-acting cabotegravir and rilpivirine: a multivariable analysis. *AIDS* 35 : 1333–1342, 2021.

## Genetic Diversity and Conservation of Lenacapavir Target Sites in Recently Diagnosed Cases with HIV-1 in the Tokai Area, Japan

Yuya GOTO<sup>1,2)</sup>, Tomoya SAWANO<sup>1,2)</sup>, Urara SHIGEMI<sup>2)</sup>, Reiko OKAZAKI<sup>2)</sup>,  
Yoshimi YAMAMURA<sup>2)</sup>, HIROTAKA ODE<sup>2)</sup>, Masakazu MATSUDA<sup>2)</sup>, Keiji YATA<sup>1)</sup>,  
Mayumi IMAHASHI<sup>2)</sup>, Yoshiyuki YOKOMAKU<sup>2)</sup> and Yasumasa IWATANI<sup>2,3)</sup>

<sup>1)</sup> Clinical Laboratory Department, and <sup>2)</sup> Clinical Research Center,  
National Hospital Organization Nagoya Medical Center,  
<sup>3)</sup> Nagoya University Graduate School of Medicine

**Objective** : In 2022, Lenacapavir (LEN), a first-in-class capsid (CA) inhibitor, was approved in the US and Europe for people infected with multidrug-resistant HIV-1. In this study, to obtain the genetic background information before LEN introduction, we performed genotypic analysis of the CA region in HIV-1 derived from 228 HIV-1-positive patients who visited Nagoya Medical Center, a block-based hospital in Tokai area, Japan.

**Methods and Results** : We first extracted plasma viral RNA within 210 treatment-naïve and 18 treatment-experienced patients who were diagnosed at Nagoya Medical Center from 2019 to 2022. Viral CA sequences were determined with nested RT-PCR followed by Sanger sequencing. Based on the determined sequences, we analyzed the previously reported LEN resistance-associated mutations and the conservation of residues in the LEN interaction pocket on CA. Consequently, among previously reported LEN resistance-associated mutations, only K70R was detected as a minority mutation in one case of subtype C. In contrast, in the LEN binding site, polymorphisms (S41T, T54M and Y169F) displaying different occurrence rates among subtypes were frequently detected. These polymorphisms were found at the outer limb of the LEN target pocket in the CA hexamer structure.

**Discussion** : Our data suggest that there was no background resistance mutations in HIV-1 to apply LEN in treating HIV-1-infected people in this region. However, further epidemiological surveillance and analysis are required to understand potential effects of such resistance-associated mutation(s) and/or polymorphic mutations against LEN-resistance acquirement in HIV-1.

**Key words** : Lenacapavir, HIV-1, capsid, drug resistance, sequence