

論文の内容の要旨

論文題目 Study of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance

ヒト免疫不全ウイルス 1 型の薬剤耐性に関する研究

第一章 Mutagenically Separated PCR (MS-PCR) Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01_AE(subtype E) Human Immunodeficiency Virus Type 1

[CRF_01AE(サブタイプ E)ヒト免疫不全ウイルス 1 型のジドブジン耐性変異である M41L と K70R を迅速に検出する変異選別 PCR(MS-PCR)法]

第二章 Contribution of Gag Non-Cleavage Site Mutations for Full Recovery of Viral Fitness in Protease Inhibitor Resistant HIV-1.

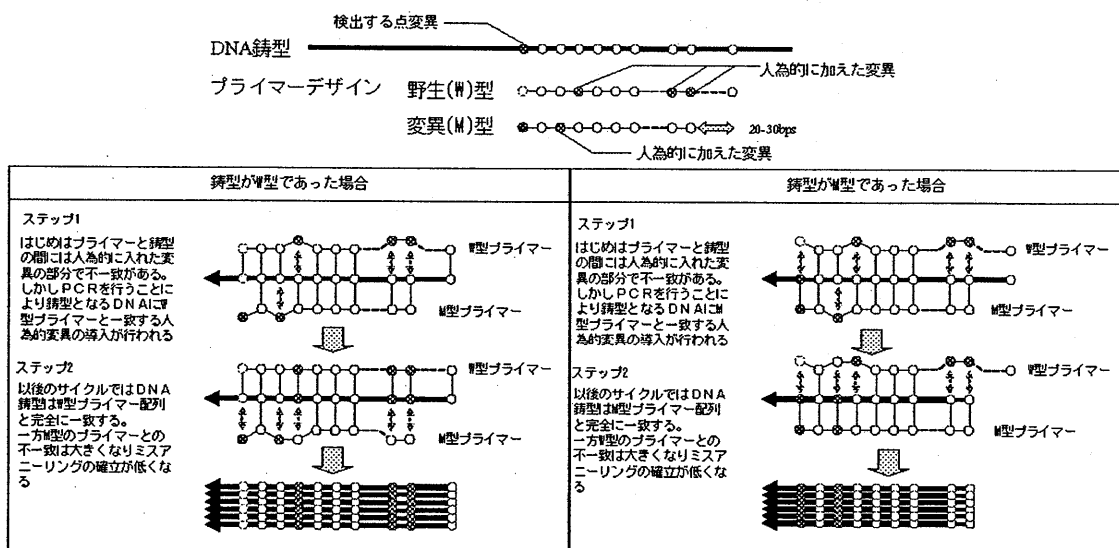
[プロテアーゼ阻害剤耐性ヒト免疫不全ウイルス 1 型のフィットネスの完全な回復への Gag の非切断部位変異の寄与]

氏名 Lay Myint

後天性免疫不全症候群(acquired immunodeficiency syndrome: AIDS)は1981年に初めて報告され、それから20年後の今日、世界中に4000万人にも上るHIV/AIDS感染者がいると推測されている。HIV感染症の薬剤治療は1986年のZidovudine(AZT)の実用化で幕を開けた。1995年にはプロテアーゼ阻害剤(PI)が登場し、強力な併用化学療法 Highly active antiretroviral therapy(HAART)が行われるようになった。この治療法は優れた効果を示し、感染者体内からのHIV-1の完全な駆逐こそ達成できなかったが、体内におけるHIV-1の増殖のほぼ完全な抑制とCD4陽性細胞数の回復を実現した。HAART導入後、欧米や日本においてはAIDSによる死亡者数の顕著な減少が報告されている。しかし、HAARTの恩恵を得るのは容易では無く、無視できない数の感染者が治療の失敗に直面している。その原因の中でも薬剤耐性ウイルスの出現はその後の治療薬剤の選択を制限するために深刻な問題である。このような薬剤耐性による治療困難症例の問題は先進諸国においてはHIV-1感染症治療の大きな問題となっている。一方、世界のHIV-1感染者総数の90%が集中するアフリカや東南アジアなどの発展途上国においては、抗HIV-1薬剤が高価であったことから、感染者たちの多くは自然経過でAIDS発症と死を迎えてきた。しかし最近2-3年の間にgeneric medicineの登場とともに発展途上国においても抗HIV薬剤の導入が可能になった。皮肉なことに治療薬剤の導入は薬剤耐性ウイルスの問題を発展途上国にも持ち込むことになった。先進諸国では薬剤耐性検査は塩基配列解析が主流となっているが、この方法はオートシーケンサーなどの高価な機器が必要であることから発展途上国にそのまま持ち込むことは容易でない。

第一章では私が発展途上国への導入を目指して開発に取り組んだ新たな検査手法

MS-PCR について述べた。この手技はタイ国への導入を念頭に置いており、従って同地での流行株である CRF01_AE(サブタイプ E)を標的に、最もよく使われてきた AZT に対する耐性変異検出系の構築を行った。AZT 耐性を呈する 6 種類の変異の中で頻度が高く変異の周辺の塩基配列が比較的保存されているコドン 41 番目のメチオニンからロイシンへの置換(M41L)とコドン 70 番目のリジンからアルギニンへの置換(K70R)を判定する二つの検査法、41MS-PCR と 70MS-PCR を構築した。MS-PCR の基本的な戦略は PCR プライマーによる野生型(W 型)と変異型(M 型)の選別である。つまりプライマー間の結合エネルギーの差を利用して増幅をコントロールする方法である。今までも診断的 PCR は行われてきたが、識別すべき標的変異のエネルギー差だけでは不十分なことが多く、信頼性は満足できるものではなかった。特に HIV-1 のように遺伝子の多様性に富む標的の場合はプライマー配列内に目的とする以外の変異が存在することがあり、PCR による判別は精度が低く困難であった。私は診断的 PCR による W 型と M 型の識別精度を上げるために、二つの改良を加えた。まず W 型用と M 型用の二つのプライマーの違いを明確にし特異性を高めるために、各々のプライマーの 3' 端領域に人為的な変異を導入した。PCR のサイクルは、最初の数サイクルをやや緩いアニーリング条件で、その後アニーリング温度を高くして行うことにより選択性と感受性を改善することに成功した(下図)。



2 番目の改良点は W 型と M 型の PCR を個別に行い判定するのではなく、両方のプライマーを同時に反応系に添加して競合をさせたことである。ゲル上での増幅産物のサイズによる判定が可能であるように 41MS-PCR では W 型産物は 214bps、M 型産物では 195bps の増幅産物が得られるように W 型プライマーを 5' 端を 19bps 長く設計した。70MS-PCR では W 型産物は 301bps、M 型産物では 284bps の産物が得られるように同様に設計した。41MS-PCR、70MS-PCR 各々の検出限界を標的 RNA 鎖を希釈して判定したところ、41W 型は平均 3.25 コピー、41M 型の場合では 8.3 コピー、70W 型では平均 6.05 コピー、70M 型では 2.7 コピーであった。M 型と W 型が混合して存在した場合 41MS-PCR、70MS-PCR と W 型は M 型の 10% まで、M 型も W 型の 10% 程度存在すれば検出することが可能であった。すなわちウイルス集簇全体の 10% 程度しか存在しない非主流集簇でも MS-PCR を用いることで検出可能であった。一般的に塩基配列解析の場合では 25% から 50% を占めていないと非主流集簇を同定することは

困難とされており、今回私が開発した MS-PCR は非主流集簇の検出に優れているといえよう。

41MS-PCR と 70MS-PCR の検査の精度を評価するために 51 症例の CRF01_AE 感染症例を選び、MS-PCR による判定結果と塩基配列解析による結果との比較を行った。その結果、41MS-PCR では 51 例中 47 例で判定結果の一致 (92%) を認めた。一方 70MS-PCR では 51 例全例で判定結果の一致を認め (100%)、41MS-PCR で一致しなかった 4 症例は何れも MS-PCR で M 型と W 型の混合と判定されたものであり、両検査方法の検出感度を考慮すると必ずしも誤判定ではないと考えられた。

以上 MS-PCR は検査精度の面で塩基配列解析と比較して遜色は無く、また手技が簡便で多検体処理に向いていることから、発展途上国における、薬剤耐性 HIV-1 のサーベイランスに有用と考えられた。

第二章では薬剤耐性 HIV-1 の病態を理解するうえで重要な因子である HIV-1 の増殖能力 (fitness) について PI 耐性変異との関連から取り上げた。薬剤耐性ウイルスは一般に野生型に比べて fitness が劣るため、耐性変異を獲得したウイルスは治療の中断など薬剤の選択圧力が消失すると時間とともに見かけ消失してしまうことが知られている。したがって、何らかの理由により長期間治療が中断していた症例の治療を再開するには注意が必要であり、このような症例の薬剤耐性の有無を判定するときには第 1 章で取り上げた MS-PCR が有効であると思われる。さて、PI 耐性変異を獲得した症例ではしばしば protease の基質である Gag の切断領域に特有の変異が認められる (切断部変異: cleavage site mutations: CSM)。CSM は PI 耐性変異を獲得したウイルスの fitness を改善させることが知られており、耐性ウイルスの生存に必須な 2 次的変異と位置づけられている。PI の投与を長期間受けていた症例では Gag 領域の配列を解析すると CSM 以外にも多数の変異誘導が認められる。この CSM 以外の変異 (非切断部位変異: non-cleavage site mutations: non-CSM) の意義についてはこれまで明確にされていなかった。私は non-CSM の意義を明らかにするために、PI 耐性変異を獲得した症例を 2 例 (Case-1, Case-2) について解析をおこなった。2 症例の PI 耐性変異と Gag 領域の変異は表 1 に示した通りである。

表 1. プロテアーゼ阻害剤耐性変異を獲得した 2 症例の Gag およびプロテアーゼ領域に認められた変異のまとめ

	Gag			Protease	
	A431V	L449F	non-CSMs	major mutations	minor mutations and others
Case-1					
clone1-1	(+)	(+)	17 loci	D30N, M46I, L90M	<u>L10I</u> , L23I, K43T, <u>I54V</u> , I62V, <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , <u>V77I</u> , I72E, <u>N88D</u>
clone1-2	(-)	(+)	16 loci	D30N, L90M	<u>L10I</u> , K43T, <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , I72E, <u>V77I</u> , <u>N88D</u>
Case-2	(+)	(-)	9 loci	M46I, L90M	<u>L10V</u> , I13V, K14R, R41K, K43R, I62V, <u>L63P</u> , <u>A71V</u> , I72T, <u>G73S</u> , <u>T74S</u>

各症例についてその *gag-protease* 領域を PCR で増幅し HXB2 に挿入してリコンビナントウイルスを作成した。挿入する患者由来遺伝子サイズとパターンを変えてそれぞれの症例について全部で以下 4 タイプのウイルスを作成した。①GP タイプ: 患者由来 *gag* と *protease* を組み込んだもの。Gag 領域には CSM と non-CSM の両方が含まれている。②P タイプ: 患者由来の *protease* のみを組み込んだもの。Gag 領域は HXB2 のものであり、CSM も non-CSM のどちらも無い。③GP^c タイプ: GP タイプから CSM のみを野生型に戻したもの。④P^c タイプ: P タイプに親ウイルスと同じ CSM を入れたもの。この 4 タイプのリコンビナントウイルスについてその増殖能力を比較解析し CSM と non-CSM の働きについて検討を行った。個別の培養系において各ウイルスと野生株 HXB2 の逆転写酵素活性がピークに達する感染後

の日数を観察し増殖能力の高いほうから並べると Case-1 の clone-1 では $HXB2=GP > P^{+C} > P = GP^C$ 、clone-2 では $GP = P^{+C} > P > GP^C$ の順番となった。どちらの clone においても順位は一致しており、GP タイプと P^{+C} タイプは同等もしくは GP の方が fitness が良く、P タイプがそれに続き、最下位が GP^C 、であった。この結果から最も fitness が回復されるには CSM の存在が必須であり、症例によっては non-CSM の存在がさらに必要となることが明らかになった。Case-2 では $HXB2=GP > GP^C > P^{+C} >> P$ の順位を呈した。このクローンでも CSM と non-CSM 両方の変異をもつクローンが最もよく増殖し、この意味において non-CSM には fitness を戻す重要な働きがあることが明らかになった。さらに興味深いことに Case-1 では患者由来 Gag から CSM のみを取り除いた GP^C クローンは最も fitness が悪く、non-CSM の働きは CSM の存在が前提となることが示唆された。一方 Case-2 では GP^C は 2 番目によく増殖しており non-CSM だけでも fitness 回復作用があることが示された。今回の解析からはプロテアーゼには Case-1 clone-1 と Case-2 のように Gag の変異が伴わないと増殖できないものと (Gag-dependent protease)、Case-1 clone-2 のように Gag の変異がなくても増殖できるもの (Gag-independent protease) と二つのタイプがあることが明らかになった。私の結果は薬剤耐性 HIV-1 の耐性レベルの評価、耐性の選択と進化、そして病態を理解するうえで Gag が重要であることを明らかにした。そして、これらの結果は患者由来ウイルス遺伝子断片を用いてリコンビナントウイルスを作成する際は Gag 領域を含めて作成することが重要であることを示唆している。