

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 Lay Myint

本研究ではヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)の治療薬剤耐性について、その疫学的状況と病態を明らかにするために、二つの課題に取り組んだ。第一に簡便、迅速そして安価に薬剤耐性 HVI-1 を検出するための PCR を応用した診断検査の開発を行った。第二に薬剤耐性変異の獲得が HIV-1 の増殖・複製に及ぼす影響をプロテアーゼと Gag 前駆体の相互干渉の解析より明らかにした。各々下記の結果を得ている。

1. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 AZT の耐性変異として知られている HIV-1 逆転写酵素コドン 41 番目のメチオニンからロイシンへの置換(M41L)、70 番目のリジンからアルギニンへの置換(K70R)を検出する診断的 PCR(mutagenically separated PCR: MS-PCR)を構築した。発展途上国、特に東南アジアでの使用を念頭に、プライマーの設計には CRF01\_AE の遺伝子配列を用いた。
2. MS-PCR では耐性変異検出の感受性と特異性を高めるために、通常の診断的 PCR に二つの改良を加えた。一つは野生型、変異型各々の検出プライマー配列に人為的な変異をいれたことであり(mutagenic separation)、もう一つは野生型、変異型の検出プライマーを競合させて反応させたことである(competition)。この二つの改良により診断精度の改善に成功した。
3. 51 例の CRF\_01AE 症例について MS-PCR とサンガー法による塩基配列解析の両方で解析を行い、両者で得られた結果を比較した。その結果 41MS-PCR、70MS-PCRともにサンガー法の結果と一致しており、MS-PCR が実用的な手法であることを証明した。
4. HIV-1 プロテアーゼとその基質である Gag 前駆体タンパク pr55<sup>Gag</sup>の相互干渉についてプロテアーゼ阻害剤耐性変異を獲得した2症例について薬剤耐性遺伝子解析を行った。その結果、Gag の切断部位(cleavage site: CSM)だけではなく、切断部以外の領域(non-cleavage site: non-CSM)

にも治療の影響を受けて多数の変異が集積していることが示された。

5. プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得した 2 症例のウイルスについて Gag とプロテアーゼを様々に組み合わせ、各々についてリコンビナントウイルスを 4 パターン作成した(患者由来の Gag とプロテアーゼを持つ GP クローン、GP クローンから CSM 変異を野生型に戻した GP<sup>c</sup> クローン、患者由来のプロテアーゼのみを持つ P クローン、そして P クローンに患者で認められた CSM を入れた P<sup>c</sup> クローン)。この 4 パターンのウイルスの増殖能力について解析を行った結果、いずれの症例についても GP クローンが最も良く増殖をした。このことから Gag の CSM の変異だけではなく non-CSM の変異もウイルスの増殖にとって重要な働きがあることが示された。
6. プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得した 2 症例それぞれの P クローンの増殖能を比較すると、一方は増殖したが、もう一方は増殖しなかった。いずれの症例においても GP クローンと P<sup>c</sup> クローンは増殖したことから、プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得したウイルスの増殖能は、獲得した耐性パターンにより、Gag の変異に依存するものと、依存しないものがあることが示された。

以上、本論文は、簡便・安価・迅速な薬剤耐性検出法を開発し、発展途上国の支援への道を開いた、また Gag 非切断部領域がプロテアーゼ阻害剤耐性を獲得したウイルスの増殖能力にとって重要な働きをしていることを明らかにした。いずれの成果も薬剤耐性 HIV-1 をよりよく理解し、克服するために重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。