

## 論文の内容の要旨

論文題目            抗 HIV プロテアーゼ阻害薬存在下で複製能亢進を示す高度薬剤耐性臨床分離株の機序に関する研究

氏名                 松岡 佐織

【背景】 Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)は、ヒト CD4 陽性細胞に感染し後天性免疫不全症候群 (AIDS) を発症させる原因ウイルスとして 1983 年に Montagnier、Gallo らによって発見された。ウイルス粒子内には遺伝情報として RNA が含まれる。HIV-1 の複製過程は、宿主細胞のゲノムに組み込まれプロウイルスになるまでの前期過程と、プロウイルスを鋳型に HIV 粒子として細胞外に放出されるまでの後期課程の 2 つに大別される。HIV-1 は宿主であるヒト生体内に入ると、CCR5 をはじめとするケモカイン受容体を介して CD4 抗原陽性細胞と結合し、細胞質内にウイルス RNA ゲノムを放出する。ウイルスゲノムは HIV-1 自身の酵素の働きにより 2 本鎖 DNA へ合成及び宿主 DNA への組み込みが行われ、プロウイルスとし生体内で潜伏する。一度宿主ゲノムに組み込まれた HIV-1 プロウイルスは、宿主細胞の酵素作用により転写、翻訳されウイルスタンパク質を合成する。合成されたタンパク質は細胞膜下から出芽し、新たな HIV 粒子として細胞外へ放出される。この一連の機構により HIV は複製され続ける。

複製の最終過程で働く HIV-1 プロテアーゼ (HIV-1 protease、以下 PR) はウイルス粒子の成熟に必須な酵素である。PR は 99 アミノ酸から構成され、ウイルス複製サイクルの後

期において基質である未成熟な前駆体蛋白質の cleavage site を切断し、成熟したウイルスの構造蛋白質及び酵素を生成する。このプロテアーゼの作用はウイルス粒子が感染性を獲得する上で不可欠である故、抗 HIV 薬の標的となっている。現在抗 HIV 薬として広く使用されているプロテアーゼ阻害薬 (protease inhibitor ; PIs) は、PR の活性中心に結合するようデザインされている。活性中心に PI が結合すると酵素活性は低下し、蛋白質の成熟過程が阻害される。結果として、ウイルスの複製は著しく抑制される。

この強い抗ウイルス効果にもかかわらず、治療中に患者生体内で薬剤耐性ウイルスが出現することが稀ではない。抗 HIV 治療中の薬剤耐性ウイルスの出現、耐性度の上昇は治療効果を著しく低下させるため、HIV-1 が薬剤耐性を獲得する機序及び耐性度上昇の機序を明確にすることはウイルス学の基礎研究分野のみならず、新たな治療薬開発、投与法の開発など臨床研究においても非常に有用であると考えられる。








現在、PI に対する耐性獲得及び耐性度の上昇について次の 3 つの機序が考えられている。第 1 に、PR と薬剤の結合を弱め、直接的に耐性に関与する変異が出現する。これらは一次変異と呼ばれ、主に PR の活性中心近傍に集約している。この変異は活性中心の構造変化を引き起こすため、ウイルスにとって耐性という利点を付与される一方で、酵素の機能低下も同時におこる。結果としてウイルスの複製能が低下することが報告されている。第 2 に、低下した PR の機能を代償するように PR の立体構造の活性中心から遠い位置に二次変異が出現する。二次変異は一次変異とは異なり直接的且つ単独で高度耐性へと導くものではなく、一次変異によって生じた歪を調整する役割を果たすことが報告されている。これによりウイルスは適応度(fitness)を回復し複製能を部分的に回復する。第 3 は上記 2 つとは異なり、基質蛋白質の二次的変異である。この変異は PR 内に複数の変異をもつ高度薬剤耐性ウイルスにしばしば認められる。耐性関連変異によって構造が変化した PR に最適化されるように基質タンパク質も変化すると考えられている。つまり、PI の選択圧がある環境下では、環境に対し適応度を増加させるために、耐性度と複製能の両者を上げる方向にウイルスは進化していると推測される。しかし、これは仮説にとどまらない。私は 1997 年より多くの臨床分離 HIV-1 株を用いて薬剤感受性試験を行ってきたが、近年では PI 服薬の長期化に伴い高頻度に高度薬剤耐性を示すウイルスが分離されるだけでなく、高度薬剤耐性 HIV 株の

[別紙 1]

中に低濃度薬剤存在下においてむしろ複製能が亢進する臨床株が混在していることに気がついた。本研究において、これら薬剤存在下で複製能が亢進する株を用いてウイルス学的解析を行い、PI 選択圧下での HIV-1 の適応進化の新規機序を明らかにした。

【方法】 Nelfinavir(NFV)長期服薬患者 1 例から経時的に提供していただいた血液を材料とし臨床 HIV-1 株 4 株を分離した。NFV 治療開始以前の血液から CL-1 を、NFV 治療開始後の血液から CL-2, CL-3, CL-4 株を分離した。このうち、NFV 服薬開始 32 ヶ月後に分離された CL-4 株は CCR5 発現-HeLa-CD4 細胞を用いた薬剤感受性試験により高度 NFV 耐性を示しただけでなく、むしろ低濃度 NFV 存在下 (0.001-0.1 $\mu$ M) で感染効率の上昇が認められた。同時に NFV の標的である protease 領域、及びその基質である gag 領域の遺伝子解析を行ったところ、CL-4 株の Gag 及び PR 領域には NFV 治療開始以前から散発的に 3 4 アミノ酸変異が存在し、治療開始後 Matrix、PR 領域特異的に新たに 22 のアミノ酸が観察された。そこで CL-4 株の NFV 依存的増殖亢進の形質発現と遺伝子変化の関与を明確にするため、Gag 及び PR 領域 (5.1kbp) を Matrix 領域 (MA)、CA 領域 N 末端領域 (NCA)、p2-NC 領域を含む CA 領域 C 末端領域 (CCA)、p1-p6 領域を含む PR 領域 (PR) の 4 つに分断し、pNL4-3 を遺伝子背景に Gag-protease 組換え HIV-1 パネルを作成し、組換え HIV-1 の増殖動態、競合 HIV-1 複製試験、NFV 感受性試験、ウェスタンブロットング解析を行った。

【実験結果】 主な結果を表にまとめた。

Gag-PR組換えHIVs	遺伝子組換え部位 <sup>§</sup>	薬剤非存在下 での複製速度	NFV存在下における 複製能亢進	NFV耐性	Gag前駆体 processing効率
NL4-3(標準的HIV-1クローン)	MA CA PR	+++	-	感受性	++
Isolate (CL-4)		+++	++	高度	
PR mt		++	-	中程度	+
p24PR mt		++	-	中程度	+
p17PR mt		+	++	高度	++
MA mt		++	-	感受性	+
MA+PRmt		+++	-	中程度	+
N-CA mt		+++	+	高度	++
C-CA mt		+	-	中程度	+

§ pNL4-3 (□) を遺伝子背景に CL-4 株由来 Gag-PR 組換えウイルスを作成した。置換した領域は青で示した。

■; NFV 治療期間中顕著な遺伝子変化が認められた領域、■; 新たな遺伝子変化は認められなかった領域。

本研究により主に 5 つの結果が示された。第一に、PR 領域を置換した PR 変異体は複製能の低下が認められたものの感染性を有し、かつ PR 変異単独でも十分に NFV 耐性能を示した。第二に NFV 期間中顕著な遺伝子変化が認められた MA、PR 領域を置換した MA+PR 変異体では有意に複製能が上昇したものの、NFV 依存的複製能亢進は認められなかった。第三に CA 領域上流を MA+PR 変異体に追加置換した NCA 変異体において複製能、Gag 前駆体の processing を亢進し且つ NFV 耐性度上昇が認められた。四つ目として CA 領域 C 末端側を追加置換した CCA 変異体は NFV 非存在下で複製能低下を示し、Gag 前駆体の processing 効率が低下した。そして最後として、CL-4 株に認められた NFV 存在下における複製能亢進の形質が十分に発現されていたのは、Gag-PR 全域を置換した p17PR 変異体のみであった。

【考察】 CL-4 株に認められる Gag 領域の MA 変異、CA-N 末端領域、CA-C 末端領域の変異は、それぞれ NFV 存在下、非存在下におけるプロテアーゼ変異体の複製能に正負の異なる影響を与えることが示唆された。これらすべての変異を含む p17PR 変異体にのみ完全な NFV 依存的複製能亢進が認められたことから、CL-4 株に認められる NFV に対する形質は単一の領域のアミノ酸配列によって再現されるものではなく、Gag および PR 領域全域のアミノ酸配列の密接な相互作用があり初めて完全な NFV に対する CL-4 株の形質が発現可能となることが示唆された。

【結語】 本研究において、NFV 存在下における複製能亢進する現象は、gag-PR の共進化が要因の一つであることを示した。このように患者生体内において特定の選択圧下では、その環境により高い適応度を上げる方向にウイルスは絶えず進化し続けている。今回私が分離したウイルスはその一つの証拠となりうると考えられる。