

博士論文

論文題目 臨床検体を用いた HIV 副受容体の使い分けとその変化に関する研究

氏名 大亀 路生

臨床検体を用いた HIV 副受容体の使い分けと
その変化に関する研究

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻
指導教官 四柳宏准教授
氏名 大亀 路生

【目次】

・	目次	2
・	用語・略語集	3
I.	要旨	6
II.	序文	7
III.	方法	2 1
IV.	結果	3 2
V.	考察	6 3
VI.	引用文献	7 3
VII.	謝辞	8 4

【用語・略語集】

本論文中で用いた略語・略号は以下の通りである。

AIDS	後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome)
ART	抗レトロウイルス療法 (antiretroviral therapy)
CCR5	C-C 型ケモカインレセプター 5
CXCR4	C-X-C 型ケモカインレセプター 4
C1-C5	<i>env</i> 遺伝子の constant 領域の 1~5
DM ウイルス	Dual (R5/4) or MIX (R5 ウイルス、X4 ウイルス、R5/X4 ウイルスが体内で混在する状態を指す)
DNA	deoxyribonucleic acid
DSP	dual split protein
Env	エンベロープ (envelope)
GFP	green fluorescent protein
gp	糖タンパク質 (glycoprotein)
GTA	genotypic tropism assay
HIV	1 型ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1)

INSTI	インテグラーゼ阻害剤 (integrase inhibitor)
IQR	inter quartile range
NNRTI	非核酸系逆転写酵素阻害剤 (Non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors)
NRTI	核酸系逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse-transcriptase inhibitors)
N4R5 細胞	CD4 と CCR5 が発現したヒトグリオーマ由来 NP-2 細胞株
N4X4 細胞	CD4 と CXCR4 が発現したヒトグリオーマ由来 NP-2 細胞株
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTA	phenotypic tropism assay
PI	プロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor)
RLU	ルシフェラーゼ活性 (luciferase activity)
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcriptase
R5 ウイルス	CCR5 指向性ウイルス
R5/X4 ウイルス	両指向性 (Dual) ウイルス

X4 ウイルス CXCR4 指向性ウイルス

V1-V5 *env* 遺伝子の *variable* 領域の 1～5

I. 要旨

HIV (human immunodeficiency virus type 1) は CD4 受容体と共に副受容体が感染に必要である。我々の研究室は副受容体使用判定を簡便にできる Cell-fusion assay の作製を目指してきた。今回 96 検体の副受容体使用を一度に判定できる方法を作製し、臨床検体の副受容体使用をクローン解析したことで、Cell-fusion assay は Geno2pheno の False Positive Rate (FPR : R5 ウイルスを間違えて X4 ウイルスと予測する確率) が 20%のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM (R5/4 ウイルスまたは R5 ウイルス、X4 ウイルス、R5/X4 ウイルスが MIX の状態) ウイルスと判定し、マイナーヴァリエントの存在と、CD4 陽性細胞数の減少との相関を示した。さらに R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスの副受容体使用の違いが、Envelope (Env)の Variable 3 領域だけでなく Constant 1 領域の違いが関与することを示した。

II. 序文

1981年に後天性免疫不全症候群（AIDS）の患者が報告された¹⁻⁴。1983年に患者からレトロウイルスが分離され、その後 AIDS の原因ウイルスとして認められて1型ヒト免疫不全ウイルス（本論文では HIV-1 を HIV と表記する）と命名された^{5,6}。翌年には CD4 受容体がウイルス感染に重要であることが抗 CD4 モノクローナル抗体を用いた感染阻止実験を行ったことで証明された⁷。一方で、CD4 受容体のみでは HIV 感染が成立しないこともわかっていた⁸。1996年に7回膜貫通型 G タンパク質である C-C 型ケモカインレセプター5（CCR5）と C-X-C 型ケモカインレセプター4（CXCR4）が CD4 受容体と共に宿主細胞に侵入する際に必要な副受容体であると判明し^{9,10}、副受容体の使用方法に応じて CCR5 指向性ウイルス（R5 ウイルス）と CXCR4 指向性ウイルス（X4 ウイルス）に分類された。両者の副受容体を使用できるウイルスは両指向性ウイルス（R5/X4 ウイルス）に分類された。一人の個体の中には R5 ウイルスや R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが混在することもあり、その場合は Dual（R5/X4 ウイルス）or MIX という意味で DM ウイルスと呼ばれる¹¹（図1）。

ウイルスが宿主細胞に侵入する過程においていくつかのステップをたどる。

まず始めにエンベロープ（Env）の糖タンパク質（gp）である gp120 が宿主細

胞の CD4 受容体に結合すると gp120 の立体構造に変化が生じ、受容体結合部位が露出し、副受容体に結合できるようになる¹²。その後、gp41 の構造が変化し six-helix bundle structure を形成し、ウイルスと宿主細胞膜の融合を引き起こしウイルスゲノムが宿主細胞質内に送り込まれ感染が成立する(図 2)。その後 HIV は図 3 の複製過程を経る。HIV は逆転写の過程で高頻度に変異する特徴をもち、複製する度に変異ウイルスが出現し、HIV は各個体内で様々な変異を持った準種 (Quasispecies) として存在している^{13,14}。副受容体使用の観点からみた場合は、ウイルスの感染初期には R5 ウイルスが大多数を占め、慢性感染期を経て CXCR4 副受容体を利用できる R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが感染患者の約半数に検出されるようになり、その出現が CD4 陽性細胞数の減少と病期の進行に関与していると考えられている¹⁵⁻¹⁷。

1990 年代後半から核酸系逆転写酵素阻害薬 (NRTI)、非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI)、プロテアーゼ阻害薬 (PI)、インテグラーゼ阻害薬 (INSTI) の中からバックボーンとして NRTI を 2 剤、キードラッグとして NRTI 以外から 1 剤を併用する抗レトロウイルス療法 (ART) が導入され HIV 感染者の生命予後は改善されるようになった (図 3)。しかし、ART をもってしても HIV を感染者体内から駆逐することはできず、生涯治療を継続し HIV の増殖を抑制す

る必要がある。そのためには良好なアドヒアランスが必要であるが、複数の薬剤内服が必要であること、多様な副作用（胃腸症状、精神神経症状、リポアトロフィー、腎・肝臓・心・血管障害など）があること、併用薬との相互作用などの問題もあり、長期に渡って内服継続する困難さがある。服薬率の低下により薬剤血中濃度が低下すると薬剤耐性ウイルスが出現し、その後薬剤選択も困難となる。新規薬剤が望まれる中、CCR5 副受容体の遺伝子多型（CCR5 Δ 32 欠失）が白人の中で見られ、ホモ接合体であると HIV に暴露した場合には HIV に感染せず¹⁸⁻²⁰、ヘテロ接合体でも CD4 陽性細胞数の減少と病期の進行が遅くなることが判明し^{21,22}、さらに副受容体が CD4 受容体とともに感染に重要であることから CCR5 副受容体と CXCR4 副受容体をターゲットにした抗ウイルス薬の開発が進んだ。CXCR4 副受容体阻害薬である AMD3100 なども開発され臨床試験も行われたが、重篤な心毒性のため採用されなかった。一方、CCR5 副受容体阻害薬であるマラビロクは、CCR5 副受容体をアロステリック阻害することで HIV の gp120 と CCR5 副受容体の結合を阻害し^{23,24}、2000 年から前臨床試験を開始し安全性と効果が証明され²⁵⁻²⁷、ART 未導入・ART 導入後の患者で R5 ウイルスのみに感染している患者に対して他の ART と併用することを条件に、2007 年に米国食品医薬品局に CCR5 副受容体を阻害する侵入阻害薬として

承認された²⁴。マラビロクはR5ウイルスのみに有効であり、X4ウイルスやR5/X4ウイルスに感染している患者には、治療失敗につながるため使用できない。それゆえ、マラビロクを使用する前には副受容体指向性を確認することが必要となる。

副受容体指向性を決定する方法には phenotypic tropism assay (PTA) と genotypic tropism assay (GTA) の二通りがある。現在、商業ベースで利用可能なPTAはTrofile[®] assay (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, USA)のみである²⁸。Trofile[®] assayは患者由来のenv遺伝子を組み込んだ発現ベクターとenv以外のHIVの遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を含んだベクターを細胞に共感染させ、複製不可能なシュードウイルスを作製し、シュードウイルスをCD4受容体とCCR5副受容体またはCXCR4副受容体を発現する細胞にそれぞれ感染させ、ルシフェラーゼ活性を見ることで副受容体指向性を決定する。一方、GTAは、envには5つのvariable領域 (V1-V5) と5つのconstant領域 (C1-C5) があるが (図4)、X4ウイルスのenv V3領域とR5ウイルスのenv V3領域を組み換えた過去の研究によりenvのV3領域が受容体指向性決定に重要であることがわかり、envのV3領域の35アミノ酸のみを遺伝子解析し副受容体指向性を決定する。GTAには、X4ウイルスがenv V3のアミノ酸の11番目と25番目がアルギニンまたはリシンで

あることが多いことから解析する“11/25 rule”やコンピューターモデルを用いた“Geno2pheno”などがある^{29,30}。PTAはシュードウイルスではあるが、実際のウイルス感染様式を取るという利点がある一方、P3施設が必要な点や、結果を得るのに時間がかかること、1検体当たり2000米ドルと高額であることなどの欠点がある。一方、GTAは安価で迅速などの利点はあるが、*env*のV3領域のみでの解析であることでその他の領域の関与が考慮されないことや、15-25%のマイナーヴァリエントが検出できないなどの欠点がある(表1)。

我々の研究室では、P3施設がなくても副受容体使用を特定できるPTAの開発を目指した。その方法は、Dual split protein (GFPとルシフェラーゼの分割タンパク質)をそれぞれ融合タンパク質として発現させ、両者を再会合することで活性が復活する特徴(図5)を用いた細胞融合法(cell-fusion assay)である³¹。簡単に説明すると、ヒトグリオーマ由来細胞株(NP-2細胞)にCD4受容体、CCR5副受容体またはCXCR4副受容体、DSP₁₋₇の3者を発現させたものをレセプター発現細胞として、ヒト胎児腎臓細胞株(293FT細胞)に患者由来のHIVの*env*とDSP₈₋₁₁を発現させたものをEnvタンパク質発現細胞としてそれぞれ準備し、CCR5副受容体発現細胞とEnvタンパク質発現細胞との細胞融合、CXCR4副受容体発現細胞とEnvタンパク質発現細胞との細胞融合が

起きるかみるものである。細胞融合が起きると、Dual split protein が再会合しルシフェラーゼの基質を加える事でルシフェラーゼ活性 (RLU) を測定する。CCR5 発現細胞のみで RLU を認めれば、R5 ウイルスと判定し、CXCR4 発現細胞のみで RLU を認めれば X4 ウイルスと判定し、CCR5 発現細胞と CXCR4 発現細胞両方で RLU を認めれば DM ウイルスと判定する (図 6)。これまでに、X4 ウイルスのラボラトリーストレインを用いた実験では良好な X4 ウイルスの検出感度を得てきた³²。

現在の cell-fusion assay は患者由来の HIV の準種の集まった状況 (Bulk) の副受容体使用を見ており、DM ウイルスと判定した場合に、R5/X4 ウイルスなのか、R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスと X4 ウイルスが混在している状況なのか判定はできない。副受容体阻害薬の使用判定のためにも感度の高い検出法の開発は重要であるが、R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスの出現を早期にモニタリングするなどクローンレベルで副受容体使用を決定することは有用となる。そこで、患者由来の HIV の準種の副受容体使用を詳細に見るための方法として、96 クローンの副受容体使用を一度に決定する High throughput cell-fusion assay を作製した。そして、cell-fusion assay を臨床検体に用いて HIV 副受容体使用を評価し、副受容体使用を決定した臨床検体を High throughput cell-fusion

assay を用いてクローン解析することで、cell-fusion assay の Bulk の副受容体使用判定の特徴を明らかにし、かつ High throughput cell-fusion assay の有用性を検討した。さらに、R5 ウイルスから R5/X4 ウイルスの副受容体使用の変化に
関与する領域を同定することを目的に解析も行った。

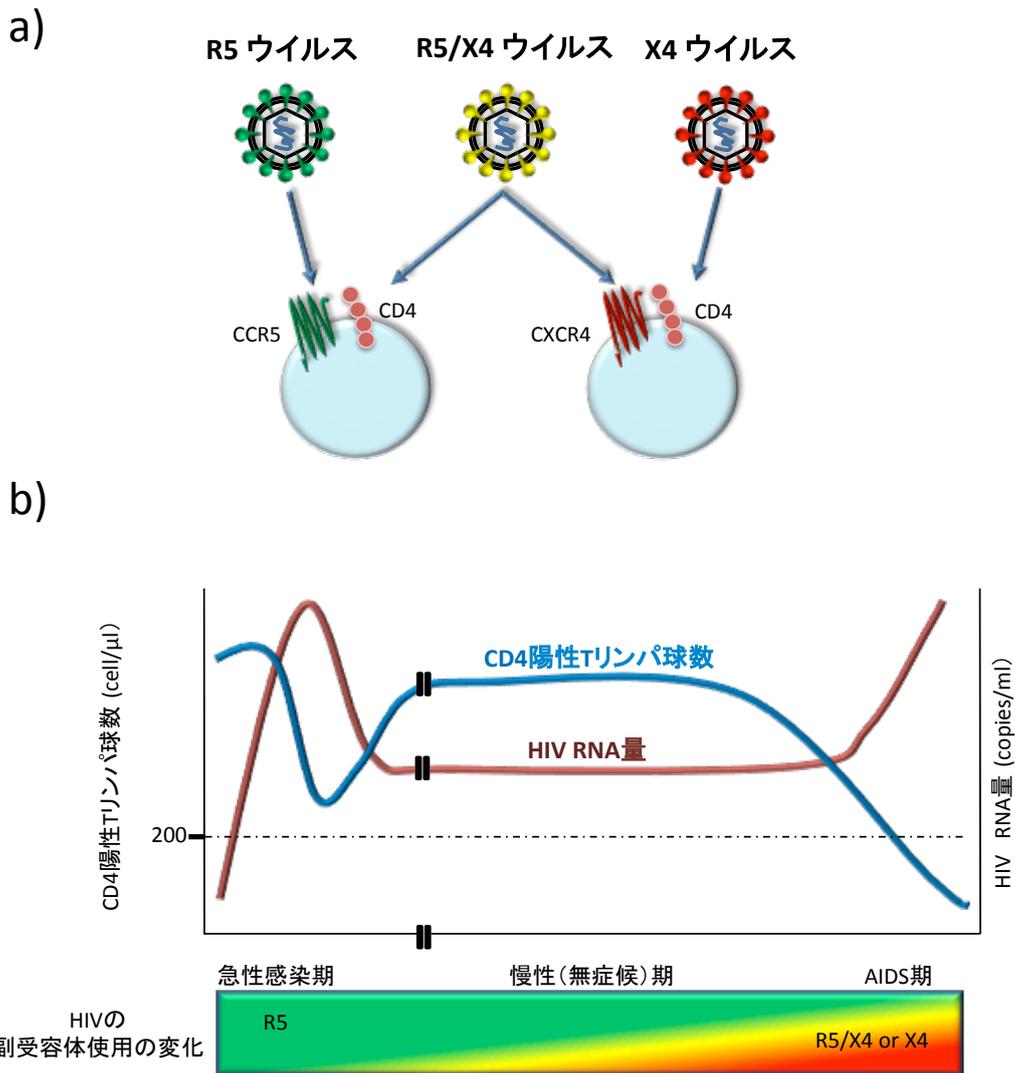


図 1. HIV の副受容体使用法と臨床経過による副受容体使用の変化

a) 緑：CCR5 副受容体を使用するウイルス (R5 ウイルス) 黄：CCR5 副受容体と CXCR4 副受容体両者を使用することが可能なウイルス (R5/X4 ウイルス) 赤：CXCR4 副受容体を使用するウイルス (X4 ウイルス)

b) 臨床経過：HIV 感染症は、急性感染期、慢性（無症候）期、AIDS 期に分けられる。ウイルス感染初期には R5 ウイルスが大多数を占め、慢性（無症候）期を経て AIDS 期に近づくにつれ CXCR4 副受容体を利用できる R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが検出されるようになる

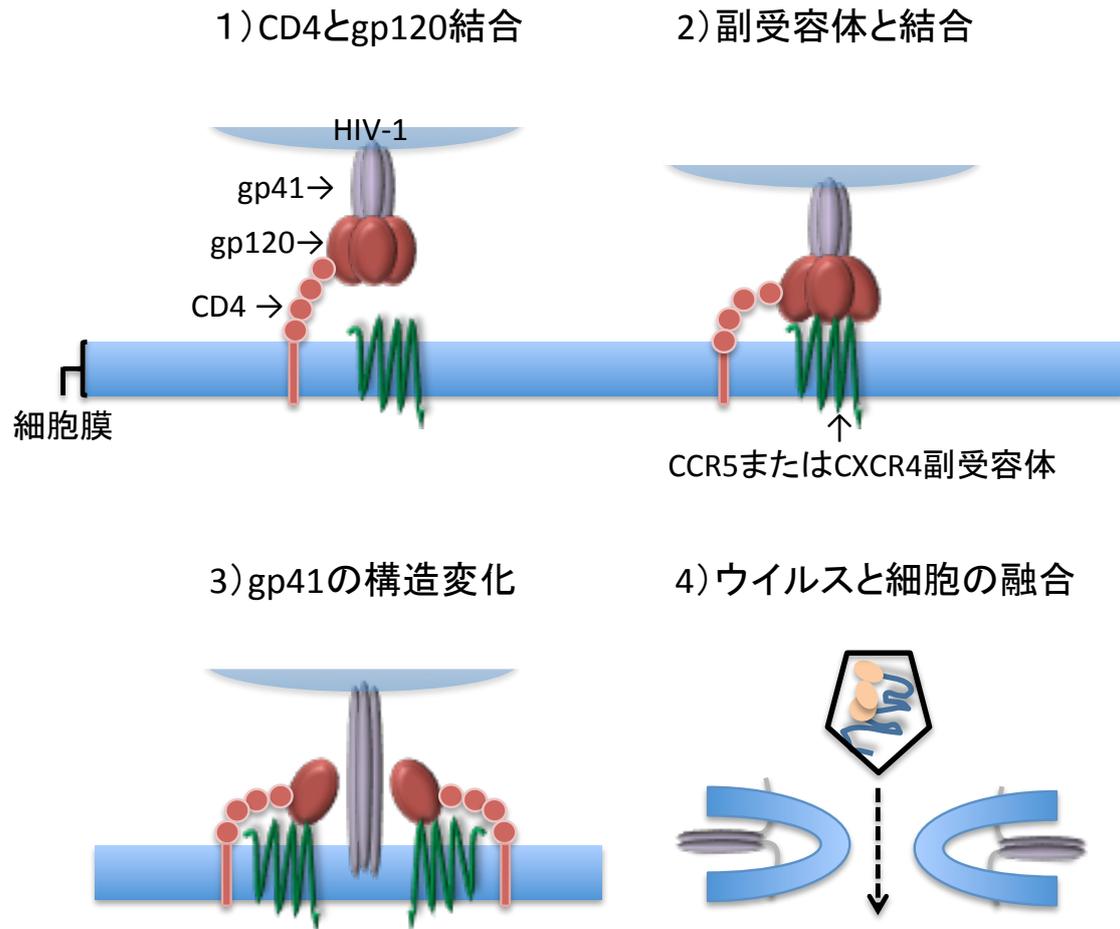


図 2. HIV の細胞への侵入過程

1) HIV の gp120 が宿主細胞の CD4 受容体に結合。2) gp120 の立体構造に変化が生じ、副受容体結合部位が露出し副受容体に結合する。3) gp41 の構造が変化し、ウイルスと宿主細胞膜の融合を引き起こす。4) 細胞融合し、ウイルス内容物が侵入する。

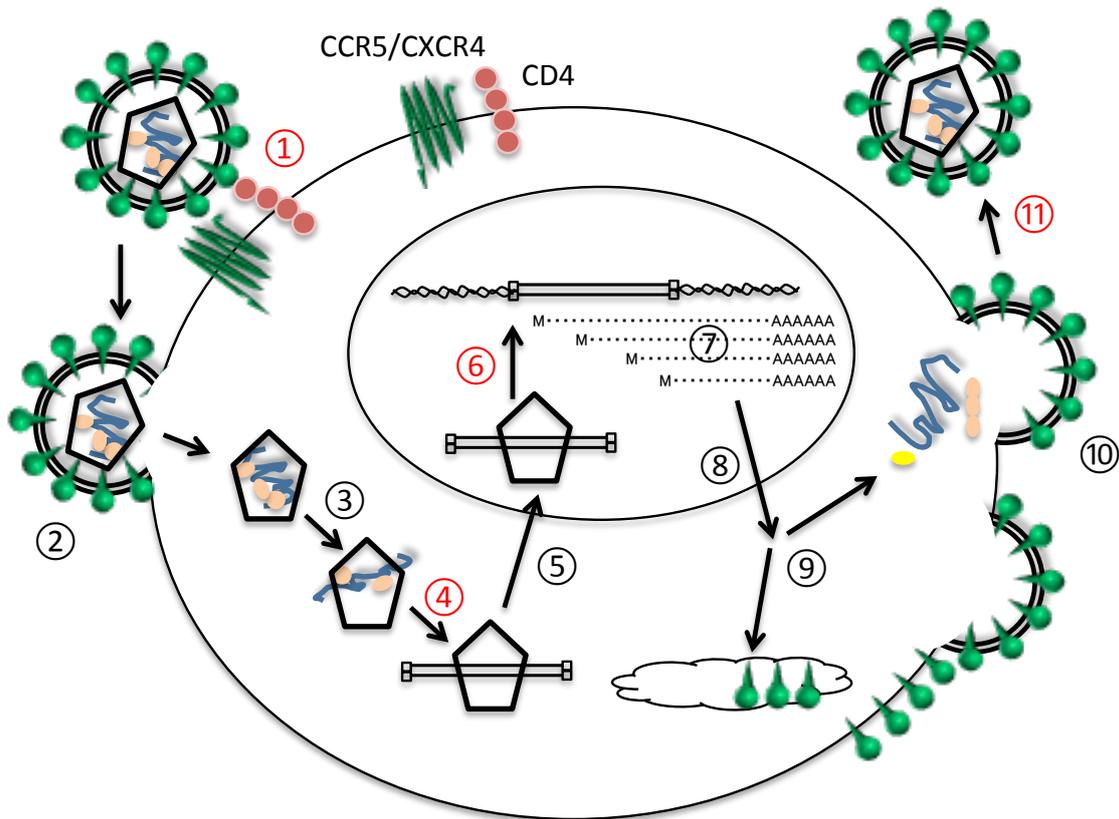
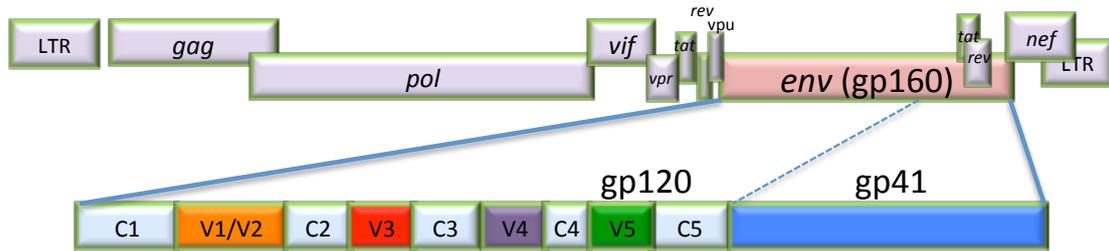


図 3. HIV-1 の複製サイクルと抗ウイルス薬の作用箇所

HIV の複製サイクルの各ステップ：①吸着、②膜融合、③脱殻、④逆転写、⑤核移行、⑥組み込み、⑦転写、⑧核外輸送、⑨翻訳・集合、⑩出芽・放出、⑪成熟。赤で示した番号が抗ウイルス薬の作用部位を示す：①CCR5 副受容体結合阻害、④逆転写酵素阻害、⑥インテグラーゼ阻害、⑪プロテアーゼ阻害

a)



b)

```

1 MRVKEKYQHLWRWGKWTMLLGILMICSATEKLVVTVVYGVVWKEATTLFCASDAKA
  YDEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLVNVTENFNMWKDDMVEQMHEDIISLWDGSLKPCV
121 KLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRDKVQKEYAFFYKLD V1/V2
  IVPIDNTSYRLISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTNV
241 STVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEDVIIRSANFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNN V3
  TRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHCNISRAKWNATLKQIASKLREQFGNNKTIIFK
361 QSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRIKQ V4
  FINMWQEVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNNNGSEIFRPGGGDMRDNRSE V5
481 LYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKRAVIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQAR
  QLLSDIVQQNNLLRATEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKL gp41
601 ICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQEKNEQELLE
  LDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLP
721 IPRGPDRPEGIEEEGGERGRDRSIRLVNGSLALIWDDLRSLCLFSYHRLRDLLLIVTRIV
  ELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNSAVNLLNATAIAVAEGTDRVIEVLQAAYRAIRH
841 IPRRIRQGLERILL
  
```

図 4. HIV エンベロープの遺伝子と構造とアミノ酸配列

a) HIV のエンベロープ gp160 は gp120 と gp41 からなる。gp120 には variable 領域 (V1-V5) と constant 領域 (C1-C5) がある。

b) ラボラトリーストレインの NL4-3 のアミノ酸配列を示す。V1-V5 と gp41 の領域に色をつけて示す。

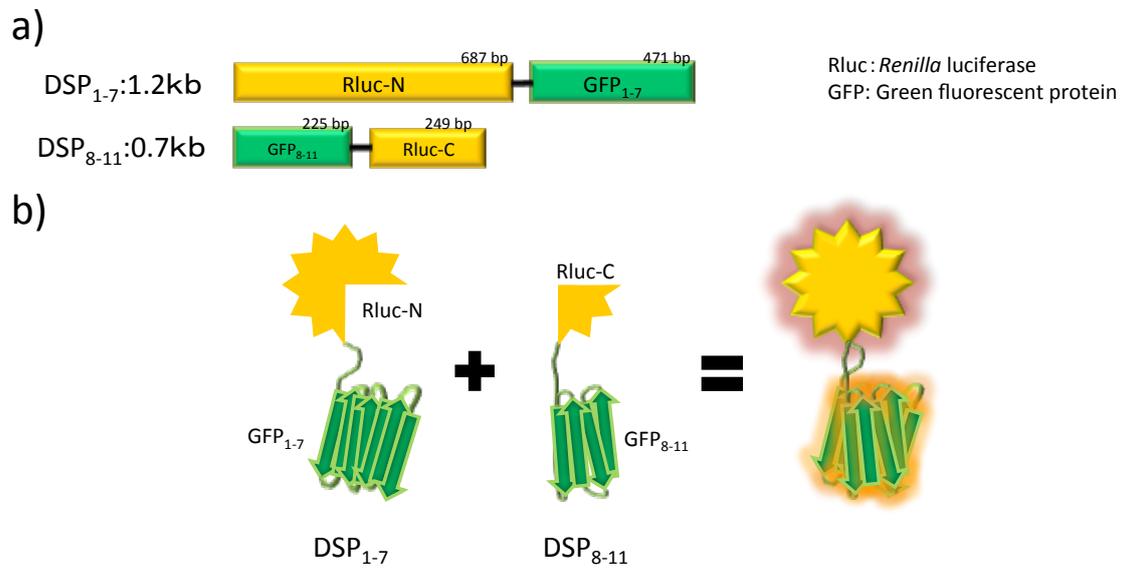


図5. Dual split protein (DSP) の概略図

a) ルシフェラーゼは 229 番目と 230 番目のアミノ酸で分割。N 末端ルシフェラーゼは Rluc-N、C 末端側は Rluc-C と呼ぶ。 GFP はβシートの 1-7 と 8-11 で分けられた (GFP₁₋₇ と GFP₈₋₁₁)。Rluc-N の下流に GFP₁₋₇ がついたものを DSP₁₋₇ とよび、Rluc-C の上流に GFP₈₋₁₁ がついたものを DSP₈₋₁₁ と呼ぶ。DSP₁₋₇ と DSP₈₋₁₁ それぞれを別々に発現させ、再会合することで活性が復活する。

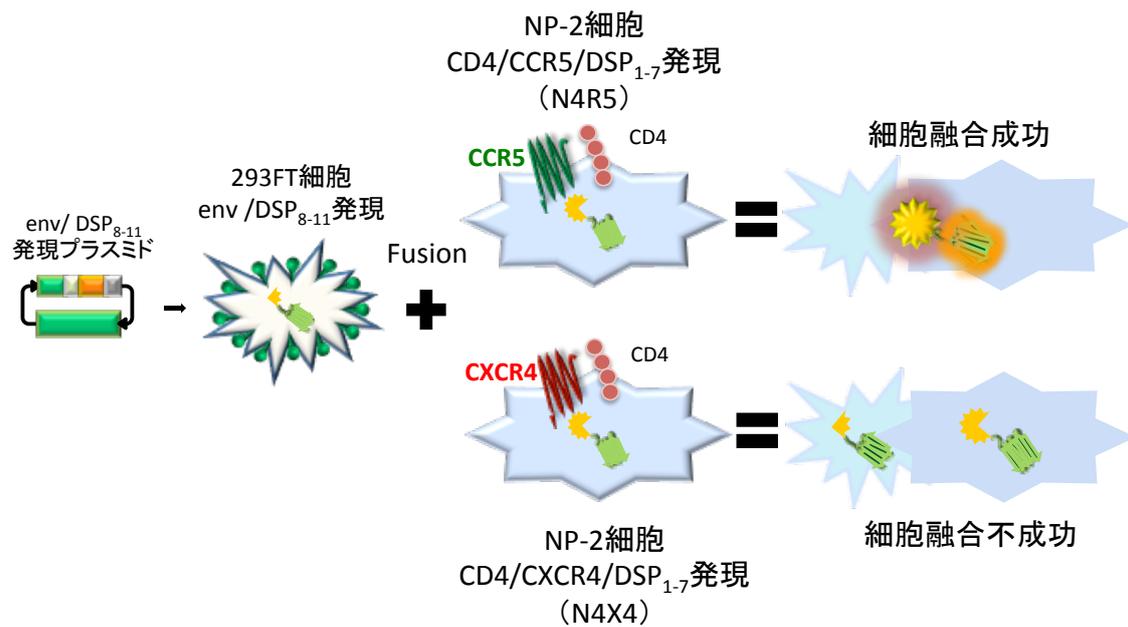


図 6. DSP を用いて Cell-fusion assay の概略図

env/DSP₈₋₁₁ 発現プラスミドを 293FT 細胞にトランスフェクションし、env と DSP₈₋₁₁ を発現。 env/DSP₈₋₁₁ 発現細胞を N4R5 細胞 (CD4/CCR5/DSP₁₋₇ を発現させた NP-2 細胞) と N4X4 細胞 (CD4/CXCR4/DSP₁₋₇ を発現させた NP-2 細胞) と共培養した。ルシフェラーゼの基質を加え、細胞融合するとルシフェラーゼ活性を認める。上記の図は、N4R5 細胞は細胞融合し N4X4 細胞は細胞融合しておらず R5 ウイルスであることを示している。N4R5 細胞と N4X4 細胞共に反応すると R5/X4 ウイルス、N4X4 のみで反応すると X4 ウイルスと判定する。

表1. Phenotypic assay とGenotypic assayの特徴

	Phenotypic assay	Genotypic assay
利点	感度が高い >0.3% 実際の表現型を反映	短時間 低コスト 各施設で可能
欠点	高価 時間がかかる(数週~) P3施設が必要	感度が低い >15-25% V3以外の考慮なし サブタイプBのみに限られる

Ⅲ. 方法

患者検体

1995年から2010年の間に東京大学医科学研究所附属病院に受診したART未導入で初診後早期と経過観察後（ART導入前）の最低2点で患者血漿が保存されている42名の患者を対象とした。初診後早期の患者検体採取の中央値は42日（inter quartile range (IQR): 0 - 72日）だった。初診後早期の患者においては検体採取日をBaselineとして臨床的解析に用いた。患者血漿はEDTAの採血管で採血後の検体を1500rpmで10分間遠心後上清の血漿成分のみを採取後80°Cの冷凍庫で使用するまで保存した。インフォームドコンセントを全患者から書面で得ており、今回の研究にあたっては、東京大学医科学研究所の倫理審査の承認も得ている（承認番号: 20-31-1120）。

細胞

レセプター発現細胞としてヒトグリオーマ NP-2 細胞に CD4 受容体と CXCR4 副受容体または CCR5 副受容体と DSP₁₋₇ がそれぞれ定常発現するよう作製された N4X4 細胞と N4R5 細胞を使用した。NP-2 細胞は MEM (modified Eagle's mediums Sigma, St. Louis, MO, USA) に非動化させた 10%Fetal

bovine serum (FBS) と 100units/ml のペニシリンと 0.1mg/ml のストレプトマイシンを入れた培地を使用した。293FT 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Sigma) に 10%FBS と 100units/ml のペニシリンと 0.1mg/ml のストレプトマイシンを入れた培地を使用した。いずれの細胞も 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

pRE11-env プラスミドの作製

HIV-1 *env* 全長は、まずウイルス RNA を患者血漿 140 μ l から QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出し、RT-PCR は SuperScript III and High Fidelity Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) を用いて 3 本のチューブでそれぞれ反応液を 15 μ l に調整し反応させた。反応液は 2 μ l の RNA、7.5 μ l の 2 \times Buffer、0.3 μ l の 5mM MgSO₄、10 μ M の Forward プライマー (Env-1F 5'-TCTGTATTGCTACTTGTGATTGCTCCATA-3') と Reverse プライマー (Env-3Rmix 5'-TGCTGTATTGCTACTTGTGATTGCTCCATR-3') (R=A+G, 存在比 1:1) それぞれ 0.3 μ l、0.6 μ l の SuperScript III and High Fidelity Platinum® Taq DNA polymerase、0.25 μ l の RNase OUT、3.75 μ l の MillQ 水を混合した。RT-PCR 反応は 55°C で 30

分、94°Cで2分反応後、94°Cで15秒、55°Cで30秒、68°Cで4分のサイクルを30回行った後、68°Cで追加5分反応させた。セカンドPCRはファーストPCR反応液3本を混合し4 μ lをテンプレートとし EnvB-2F-Xba (5'-TAGCTCTAGAACGCGTCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAG-3') と EnvB-4R-Xho(5'-TAGCCTCGAGACCGGTTACTTTTTGACCACTTGCCACCCAT-3')の10 μ Mプライマーを2 μ lずつ、5 μ lの10 \times Buffer、1 μ lのdNTP、2 μ lの50mM MgSO₄、0.5 μ lのPlatinum® PCR SuperMix HighFidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen) , MillQ水を混合し反応液を50 μ lに調整した。PCR反応は94°Cで1分反応後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、68°Cで4分のサイクルを30回行った後、68°Cで追加5分反応させ、4°Cで冷却。PCR反応液50 μ lを5本のチューブそれぞれで行った後、5本を混合しMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製したPCR産物をXba IとXho Iで制限酵素処理した後、1.2%のアガロースゲル電気泳動で約3-kbのPCR産物を確認後、目的のバンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen)を用いて精製した。精製したPCR産物はXba IとXho Iサイトを持ったpRE11ベクターにライゲーション反応で挿入しHIV envとDSP₈₋₁₁を発現するプラスミド(pRE11-envbulk)を作製した。pRE11-envbulkをJM109コンピテントセルにトランスフ

オーメーションし LB 寒天培地にまいた後 37°Cで一晩インキュベートした。LB 寒天培地に 100 コロニー以上認めた場合コロニー全てを回収し、5ml の LB 液体培地に混入し 37°Cで 6 時間インキュベート後、PureYield™ Plasmid Mini Prep System (Promega) を用いて pRE11-env bulk プラスミド DNA を精製した。LB 寒天培地に生えたコロニー全て集めたものを「Bulk」、一方、LB 寒天培地に生えたコロニーのうち一つだけ選んだものを「Clone」とよぶ。Bulk は患者血漿内の HIV の RNA 全体を反映したものとして使用した。患者血漿から env/DSP₈₋₁₁ 発現プラスミド作製の概略図を図 7 に示した。High throughput cell-fusion assay によりクローンの解析時には、LB 寒天培地に認めたコロニーをランダムに 1 つずつ総計 96 クローン選び、96 ウェルプレートで 1.2ml の LB 液体培地で培養後に Wizard® SV96 Plasmid DNA Purification System (Promega) を用いて pRE11-env プラスミド DNA を精製した。

Cell-fusion assay

トランスフェクションする前日に 24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2.8×10^5 の 293FT 細胞になるように 500 μ l ずつ分注し一日培養後にプレートの面積の 70-80% になるように培養した。pRE11-env プラスミドは FuGENE 6

Transfection Reagent (Promega) を用いて 293FT 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションと同日に 96 ウェルの optical bottom 培養プレート (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, New York, USA) に 1 ウェル当たり 2×10^4 の濃度の N4X4 細胞または N4R5 細胞をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつまき 37°C で培養した。トランスフェクションから 48 時間後に、293FT 細胞の液体培地のみを吸引で取り除きそこへ 1ml の Phosphate buffered saline (PBS) (SIGMA) をそれぞれのウェルに入れピペットで懸濁した。細胞融合させるために、293FT 細胞を 1 ウェル当たり $100 \mu\text{l}$ ずつ N4X4 細胞または N4R5 細胞がまかれた 96 ウェルプレートに共培養した。 37°C で 6 時間培養した後、EnduRen™ Live Cell Substrate (Promega) を各ウェルに入れ 90 分 37°C で反応させた後、Glomax 96 microplate luminometer (Promega) でルシフェラーゼ活性を測定した。副受容体阻害薬を用いた阻害実験では、細胞融合させるために 293FT 細胞を N4X4 細胞または N4R5 細胞に混ぜる前に、CCR5 副受容体阻害薬であるマラビロクと CXCR4 副受容体阻害薬である AMD3100 は最終濃度が $2 \mu\text{M}$ になるように、それぞれ N4R5 細胞と N4X4 細胞に入れ 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で 90 分培養した。同一のサンプルは 3 ウェル用いてルシフェラーゼを測定した。陽性コントロールとして R5 ウイルスはラボラトリーストレ

インの BaL、X4 ウイルスは NL4-3 を用いた。N4R5 細胞、N4X4 細胞それぞれのバックグラウンドの陰性コントロールとして、N4R5 細胞は NL4-3 を N4X4 細胞は BaL を用いた。カットオフラインは陰性コントロールの平均値 (n=20) + 2 SD を用いた。

High throughput Cell-fusion assay

トランスフェクションする前日に 96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 0.44×10^5 の 293FT 細胞になるように $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し一日培養後にプレートの面積の 70-80%になるように培養した。pRE11-env プラスミドは FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega) を用いて 293FT 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションと同日に 96 ウェルの optical bottom 培養プレート (NUNC, Thermo Fisher Scientific Inc, New York, USA) に 1 ウェル当たり 2×10^4 の濃度の N4X4 細胞または N4R5 細胞をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつまき 37°C で培養した。トランスフェクションから 48 時間後に、293FT 細胞の液体培地のみを吸引で取り除きそこへ 150ul の PBS (SIGMA) をそれぞれのウェルに入れピペットで懸濁した。セルフュージョンさせるために、293FT 細胞を 1 ウェル当たり $100 \mu\text{l}$ ずつ N4X4 細胞または N4R5 細胞がまかれた 96 ウェルプレ

ートに共培養した。37°Cで6時間培養した後、EnduRen™ Live Cell Substrate (Promega) を各ウェルに入れ90分37°Cで反応させた後、Glomax 96 microplate luminometer (Promega)でルシフェラーゼを測定した。陽性コントロールとしてR5ウイルスはラボラトリーストレインのBaL、X4ウイルスはNL4-3を用いた。N4R5細胞、N4X4細胞それぞれのバックグラウンドの陰性コントロールとして、N4R5細胞はNL4-3をN4X4細胞はBaLを用いた。カットオフラインは陰性コントロールの平均値 (n=24) + 2SDを用いた。

N4X4細胞における検出限界の決定方法

pRE11-env プラスミドを FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega) を用いて 293FT 細胞にトランスフェクションする際、ラボラトリーストレインの R5 ウイルスである BaL と X4 ウイルスの NL4-3 の pRE11-env プラスミドを割合 (BaL/NL4-3) がそれぞれ、100/0、99/1、95/5、90/10、50/50、20/80、10/90、5/95、1/99、0.5/99.5、0.1/99.9、0/100 となるように混合した。N4X4 細胞において様々な RLU を示した 16 個のクローンの検出限界も BaL と R5/X4 クローンをそれぞれ 100/0、99/1、95/5、90/10、50/50、20/80、10/90、5/95、1/99、0.5/99.5、0.1/99.9、0/100 の割合で混合した。プラスミドを混合させた点以外

は High throughput cell-fusion assay と同様な方法で行った。

Genotypic tropism assay である Geno2pheno による FPR の算出

pRE11-env bulk または pRE11-env clone をテンプレートとして 5' と 3' の両側から E110 (5'-CTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAA-3') と Er115 (5'-AGAAAAA TTCCCCTCCACAATTAA-3') のプライマーを用いて遺伝子解析を ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 用いて行った。env の V3 領域の遺伝子配列を Web 上の Geno2pheno algorithm (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>) に入力し False positive rate (FPR) を算出した。FPR とは R5 ウイルスを間違えて X4 ウイルスと判断してしまう確率のことであり、FPR が低いほど X4 ウイルスである可能性が高いと判断される。

点変異体 (ポイントミューテーション) の作製

ワンポイントミューテーションの導入には QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いた。5 μ l の 10 \times buffer、25ng のプラスミド DNA、10 μ M プライマーを 1 μ l ずつ、1 μ l の dNTP、MillQ 水で 50 μ l に反応液を調整した後、1 μ l の PfuUltra HF DNA polymerase を入れた。2278

-90 (R5 ウイルス) の env の 51 番目のアミノ酸を N→K に変えるためにプライマーは 2278-90-K-F(CCTGTGTGGAAAGAAGCAAAAGGCCACTCTATTTTGTGCATC),2278-90-K-R(GATGCACAAAATAGAGTGGCCCTTTGCTTCTTTCCACACAGG)を用い、2278-70 (R5/X4 ウイルス) の env の 51 番目のアミノ酸を K→N に変えるプライマーは 2278-70-N-F(CCTGTGTGGAAAGAAGCAAATGCCACTCTATTTTGTGCATC),2278-70-N-R(GATGCACAAAATAGAGTGGCATTTGCTTCTTTCCACACAGG)を用いた。反応は 95°C で 30 秒反応後、95°C で 30 秒、55°C で 1 分、68°C で 10 分を 18 サイクル行った後、1 μl の Dpn I を入れ 37°C で 1 時間反応させ制限酵素処理を行った後は JM109 コンピテントセルにトランスフォーメーションし LB プレートにまいた後 37°C で一晩インキュベートした。LB プレートに認めたコロニーをランダムに選び、2ml の LB 液体培地で培養後に PureYield™ Plasmid Mini Prep System (Promega)を用いてプラスミド DNA を精製した。ミューテーションの確認は env の全長を遺伝子解析しワンプointのみミューテーションが入っていることを確認した。

統計解析

統計学的解析は、患者 40 名の Bulk でみた経時的な副受容体使用の解析 (図

10) では Wilcoxon matched-pairs signed rank test を用い、経時的にみた副受容体使用が R5→DM であった 8 名それぞれの R5/X4 ウイルスクローンの割合と N4X4 細胞における RLU の比較 (図 15)、初診後早期の副受容体使用で分けた患者特性 (表 3)、副受容体使用の変化と臨床的特徴 (表 4) の解析には Mann-Whitney's U test を用いた。経過中の CD4 陽性細胞数減少のカプラン・マイヤー解析 (図 18) では Log-rank Test を用いた。R5 から R5/X4 の変化に関する可能性のあるアミノ酸の解析 (表 5) では Fisher's exact test を用いた。統計解析には Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software, Inc) ソフトウェアを使用した。有意水準は $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

構造モデリング

HIV エンベロープ三量体の構造データ (PDB code 4NCO) は Protein Data Bank から取得し、構造モデリングソフト Coot (Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 2126–2132 (2004).) を用いて手動でアミノ酸置換を行った。構造モデルは PyMOL (DeLano Scientific; <http://www.pymol.org>) を用いて描画した。

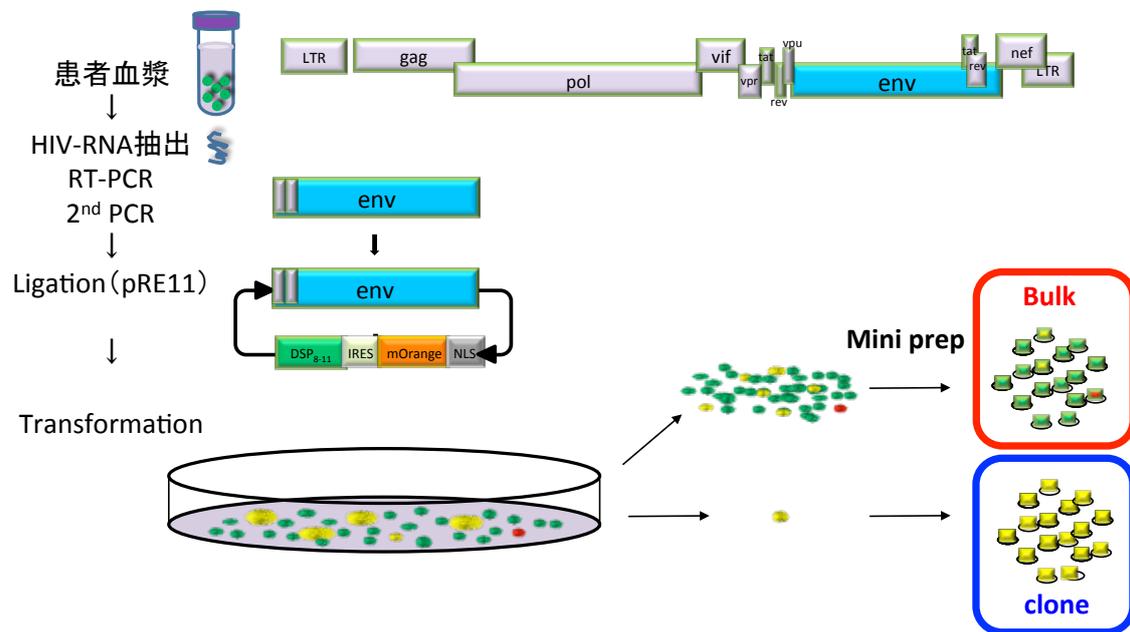


図 7. 患者血漿から *env*/DSP₈₋₁₁ 発現プラスミドの作製までの概略図

患者血漿から HIV の RNA を抽出し、RT-PCR、2ndPCR を行い *env* 全長を作製。*env* 全長を *env*/DSP₈₋₁₁ 発現ベクター (pRE11) にライゲーション。ライゲーション後の産物をトランスフォーメーションし LB 寒天培地にまく。LB 寒天培地に生えたコロニー全て集めたものを miniprep したものを「Bulk」、一方、LB 寒天培地に生えたコロニーのうち一つだけ選び miniprep したものを「Clone」とよぶ。Bulk は患者血漿内の HIV の RNA 全体を反映したものとして使用した。

IV. 結果

患者検体の HIV のサブタイピングと初診患者の臨床的特徴

42名の患者血漿由来 HIV の *env* V3 領域を含む 400 塩基とデータバンクに登録されているサブタイプ A から G までの代表的な遺伝子配列を用いて近隣結合法 (NJ 法) で系統樹解析しサブタイピングした結果を図 8 に示す。初診時早期の 42 検体のうちサブタイプ AG とサブタイプ AE を 1 検体ずつ認め、残りの 40 検体はサブタイプ B であった。サブタイプ B を有する初診後早期の患者 40 名をその後の研究に用いた。初診後早期患者の臨床的特徴を表 2 に示す。40 名うち 39 名が男性。年齢の中央値は 31 歳。初診時の CD4 陽性細胞数は中央値で 426 $\text{well}/\mu\text{l}$ 、ART 開始前の CD4 陽性細胞数は 275 $\text{well}/\mu\text{l}$ 、観察期間は中央値で 66 ヶ月であった。

表2 初診患者の特徴

Characteristic	all (n=40)
Gender : male	39
Age, median (IQR), year	31 (25 – 36)
CD4+ T cell count at diagnosis, median (IQR), cells/ μ l	426 (350 – 558)
CD4+ T cell count at at ART intiation or final appearence, median (IQR), cells/ μ l	275 (204 – 346)
Viral load at diagnosis, median (IQR), log copies/ml	4.0 (3.4 – 4.5)
Viral load at ART intiation or final appearence, median (IQR), log copies/ml	4.5 (3,8 – 4.9)
Follow-up period, median (IQR), month	66 (47 – 81)

IQR: interquartile range

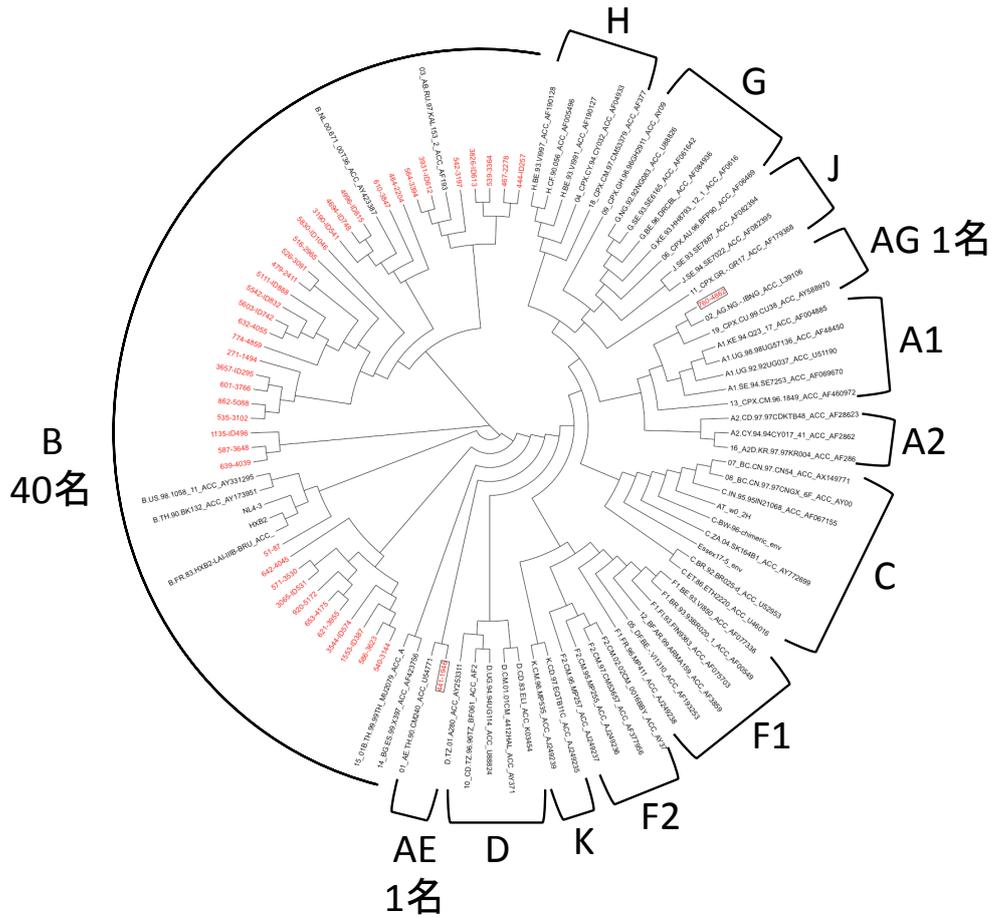


図 8. 用いた患者検体の *env* 遺伝子領域の系統樹解析

42名の患者血漿中の HIV *env* 遺伝子 V3 領域 400 塩基 (赤字) と既発表のコントロール配列を含む近隣結合法 (NJ 法) によって解析した。アルファベットはサブタイプを示す。

初診後早期患者 40 名の Bulk の Cell-fusion assay でみた副受容体使用

初診後早期患者 40 名の Bulk（血漿 RNA 中の HIV 全体を反映するように形質転換後の全てのクローンを集めたもの）の副受容体使用を cell-fusion assay で判定した結果を図 9 に示す。R5 ウイルスと判定された患者は 15 名で CXCR4 発現細胞（N4X4 細胞）のルシフェラーゼ活性（RLU）は Cut off 値以下で、CCR5 発現細胞（N4R5 細胞）のルシフェラーゼ活性（RLU）は中央値で 45968 RLU であった。一方、DM ウイルスと判定された患者は 25 名で N4X4 細胞の RLU は中央値で 3836 RLU、N4R5 細胞の RLU は中央値で 49656 RLU であった。

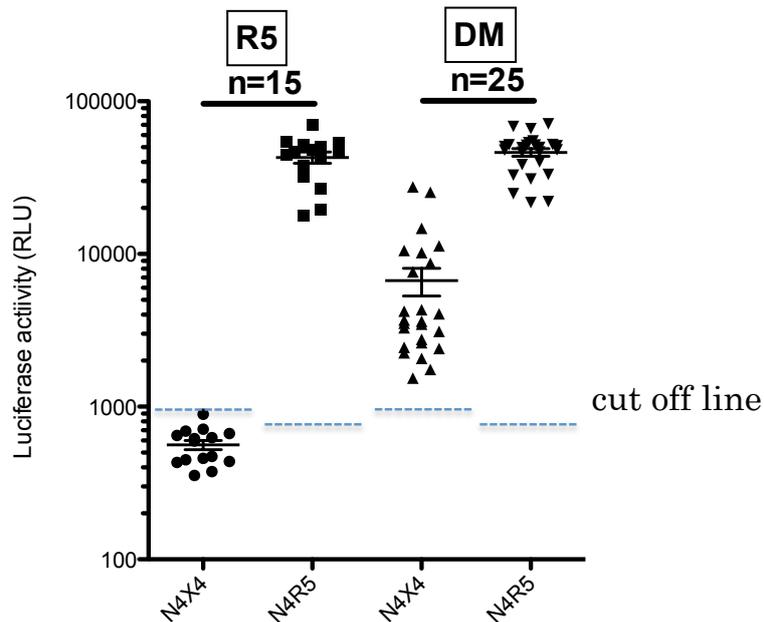


図 9. 初診後早期の血漿サンプルの副受容体使用の解析

40名の初診後早期の血漿から *env* 領域を増幅し、Bulk（血漿 RNA 中の HIV 全体を反映するように形質転換後の全てのクローンを集めたもの）の副受容体使用を解析した。縦軸：ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸：N4X4 細胞 (CXCR4 発現細胞)、N4R5 細胞 (CCR5 発現細胞) は、それぞれ CXCR4 副受容体使用、CCR5 副受容体使用の指標細胞を示す。破線はカットオフラインを示し、陰性コントロールの平均値 + 2SD とした。第 1, 2 列は、CCR5 副受容体を使用する (R5 ウイルス) と判定された 15 検体。第 3, 4 列は CXCR4 副受容体と CCR5 副受容体を使用できる (dual/mix : DM ウイルス) と判定された 25 検体を示す。

患者 40 名の Bulk でみた経時的な副受容体使用の解析

初診後早期 R5 ウイルスと DM ウイルスであった患者の経時的な副受容体使用の変化を検討するために、初診後早期 R5 ウイルスまたは DM ウイルスであった 40 名の経過観察後の副受容体使用を決定した。その結果、初診時 R5 ウイルスであった 15 名のうち 7 名は R5 ウイルスのまま (R5→R5)、8 名は DM ウイルスに変化 (R5→DM) であった。一方、DM ウイルスであった 25 名は全て DM ウイルスのまま (DM→DM) であった。R5→R5 と R5→DM と DM→DM それぞれの N4R5 細胞、N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU) の経時的な変化を図 10 に示す。N4R5 細胞の RLU に関しては 3 つの群全てにおいて差は認めなかったが、N4X4 細胞の RLU に関しては、DM→DM 群において有意に上昇している結果となった ($p = 0.0383$)。R5→DM では副受容体使用の変化群であり N4X4 細胞の RLU の上昇を認めた。

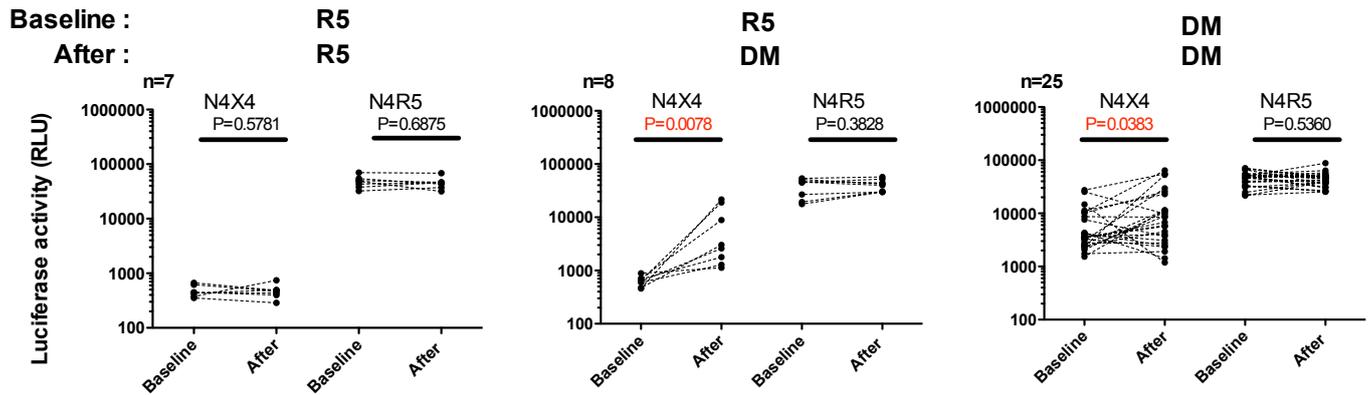


図 10. 患者 40 名の Bulk でみた経時的な副受容体使用の解析

初診後早期 (baseline) 及び経過観察後 (after) の経時的な副受容体使用が R5 → R5 (7 名)、R5 → DM (8 名)、DM → DM (25 名) と判定された患者のルシフェラーゼ活性 (RLU) を示す。縦軸: ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸: baseline、初診後 4w (median) ; after、初診後 291w (median)。N4X4 細胞 (CXCR4 発現細胞) と N4R5 細胞 (CCR5 発現細胞) は、それぞれ CXCR4 副受容体使用、CCR5 副受容体使用の指標細胞を示す。統計学的解析には Wilcoxon matched-pairs signed rank test を用い、有意水準は $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

患者 40 名の Bulk の副受容体阻害薬による解析

40 名の初診後早期と経過観察後の 2 点（総計 80 検体）を cell-fusion assay を行った結果、R5 ウイルスが 22 検体、DM ウイルスが 58 検体得られた。それぞれの検体の副受容体使用が非特異反応でないこと確認するために、N4X4 細胞に対しては CXCR4 副受容体阻害薬である AMD3100、N4R5 細胞に対しては CCR5 副受容体阻害薬であるマラビロクを用いて副受容体阻害実験を行った（図 11）。N4X4 細胞に反応した 58 検体全て（100%）で AMD3100 による阻害がみられ、N4R5 細胞に反応した 80 検体中 73 検体（91.3%）でマラビロクによる阻害がみられた。

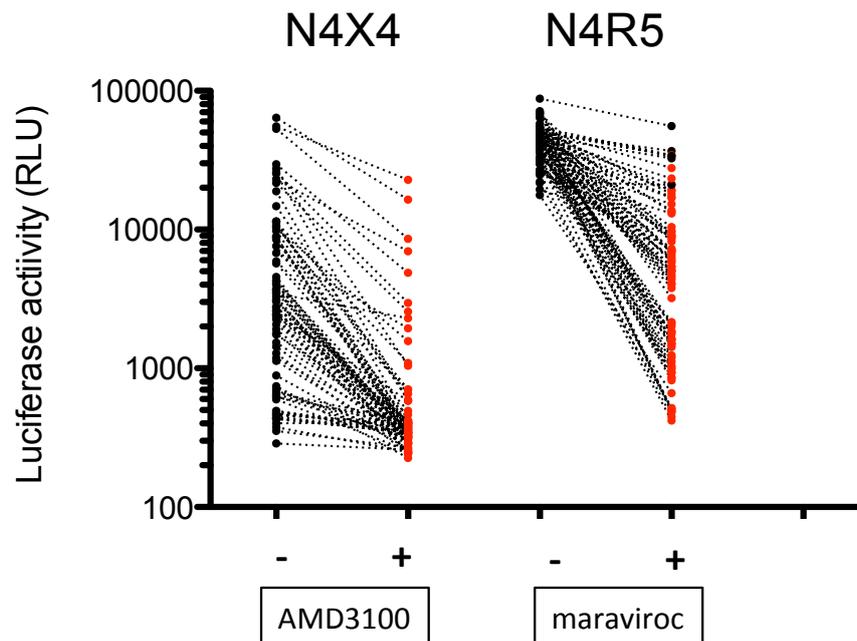


図 11. 患者 40 名の Bulk でみた副受容体阻害薬による解析

40 名の初診後早期 (baseline) 及び経過観察後 (after) のそれぞれ合わせて 80 検体の副受容体阻害実験の結果を示す。AMD3100: CXCR4 副受容体阻害薬、マラビロク (maraviroc): CCR5 副受容体阻害薬。RLU が 50%以上低下した場合を阻害ありと判定した。縦軸: ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸: 1 列、2 列; N4X4 細胞 (CXCR4 発現細胞) に対し、AMD3100 なし、AMD3100 あり、3 列、4 列; N4R5 細胞 (CCR5 発現細胞) に対し maraviroc なし、maraviroc あり。赤: 副受容体阻害薬で阻害できた検体を示す。

High throughput cell-fusion assay の作製

Cell-fusion assay は患者由来の HIV の準種の集まった状況 (Bulk) の副受容体使用を見ており、DM ウイルスと判定した場合に、R5/X4 ウイルスなのか、R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスと X4 ウイルスが混在している状況なのか判定はできない。そこで、Cell-fusion assay で判定した患者由来の HIV の準種 (Bulk) の副受容体使用を詳細に見るための方法として、96 クローンの副受容体使用を一度に決定する High throughput cell-fusion assay を作製した。その模式図を図 12 に示す。クローン解析は Bulk 1 検体当たり 96 クローンを用いた。クローン 96 個を一度にミニプレップし、96 ウェルプレートを用いて、Transfection から Co-culture まで行える様にした。さらに、96 クローンをそのまま一度に遺伝子解析も行え、その後の Geno2pheno の解析も簡便に行える様にした。開発した High throughput cell-fusion assay の検出限界を図 11 に示す。オリジナルの cell-fusion assay の検出限界は X4 ウイルスであるラボラトリーストレインの NL4-3 を用いた場合 0.1%であったが、High throughput cell-fusion assay でも同様に NL4-3 の検出限界は 0.1%と同様な検出力を認めた (図 13)。High throughput cell-fusion assay を構築し、96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能にした。

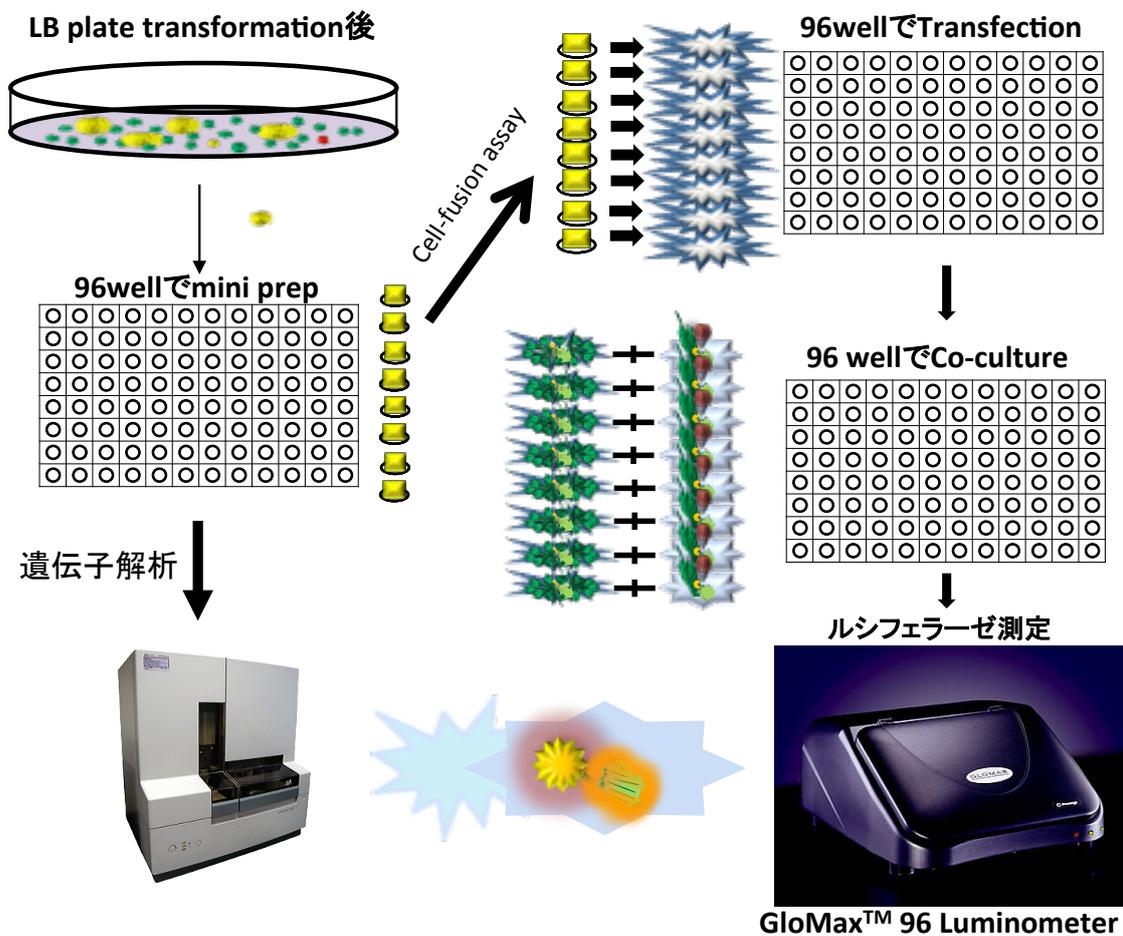


図 12. クローンを用いた High throughput cell-fusion assay の模式図
 LB 寒天培地に生えた大腸菌のコロニーを 96 個選んで、96 穴プレートで培養の上、プラスミド DNA を採取する。その後 96 穴プレートのまま、細胞融合アッセイや塩基配列解析も可能である。

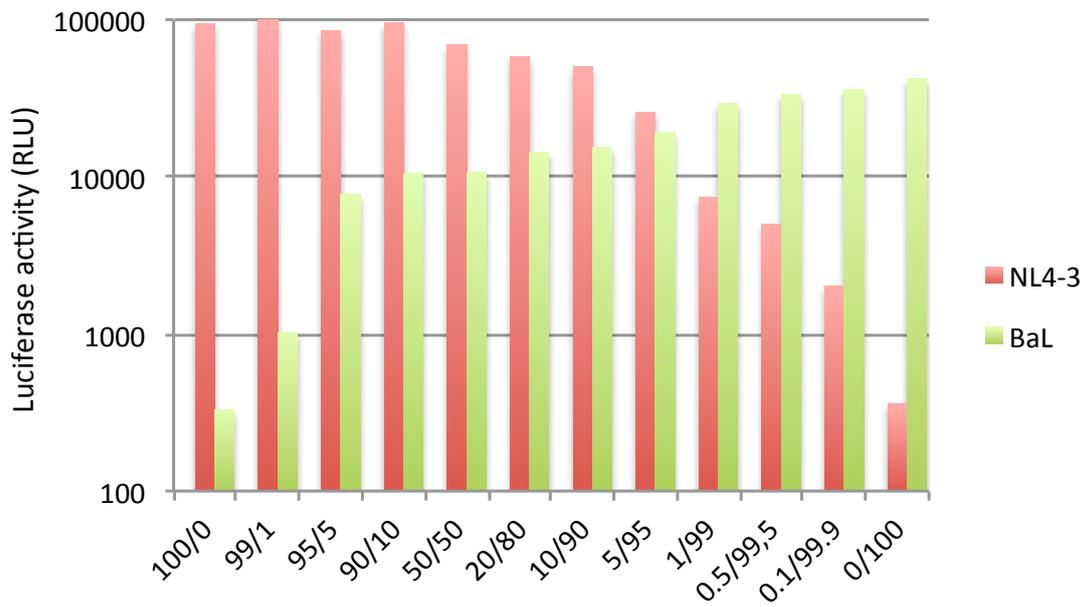


図 13. High throughput cell-fusion assay の検出限界

ラボラトリーストレインの BaL (R5 ウイルス)は緑、NL4-3 (X4 ウイルス) は赤で示す。縦軸：ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸：BaL と NL4-3 の混合の割合を示す (NL4-3/BaL)

High throughput cell-fusion assay を用いた Bulk で認めた副受容体使

用の違い (R5 と DM) のクローンによる解析

副受容体の使用が初診後早期は R5 ウイルスで経過観察後が DM ウイルスであった 8 名の初診後早期と経過観察後の検体それぞれ合わせて 16 検体を用いてクローン解析した。96 クローンをミニプレップし、High throughput cell-fusion assay で Clone 解析した結果を図 14 に示す。96 クローンのうち High throughput cell-fusion assay で反応を示したクローンの割合は、中央値で 65.1% (29.2 - 80.2%) であった。初診後早期 Bulk で R5 ウイルスと判定された 8 検体の 96 クローンの中には、N4X4 細胞にも反応を示す R5/X4 ウイルスクローンを認め、その割合は 0 - 32.3% であった。初診後早期 Bulk で R5 ウイルスの 8 検体と経過観察後 DM ウイルスであった 8 検体それぞれの R5/X4 ウイルスクローンの割合と N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU) の比較をした結果を図 15 に示す。N4X4 細胞に反応したクローンの割合は R5 ウイルス群で中央値 4.7%、DM ウイルス群で中央値 32.8% と DM ウイルス群で R5/X4 ウイルスクローンの割合は多い結果となった。R5/X4 クローンの N4X4 細胞の RLU の比較では、R5 ウイルス群では RLU の中央値は 2276、DM ウイルス群では 8747 と DM ウイルス群の R5/X4 ウイルスクローンで高い結果となった。この結果よ

り、Bulk で R5 ウイルスと DM ウイルスと判定する違いは、R5/X4 ウイルスクローンの割合と RLU の違いが関係すると考えられた。

そこで N4X4 細胞に対しさまざまな RLU を示した R5/X4 ウイルスクローンそれぞれの N4X4 細胞で反応ありと判定されるために必要なクローンの割合(検出限界)をみることにした。その結果は図 16 に示す。N4X4 細胞の RLU が 1000 - 10000 の間の R5/X4 ウイルスクローンでは 20 - 40%の割合で存在することで Bulk の状態で DM ウイルスと判定でき、RLU が 10000 以上の R5/X4 ウイルスクローンでは 20%あれば Bulk の状態で DM ウイルスと判定できる結果となった。N4X4 細胞の RLU が 10000 以上の中でも RLU が高い R5/X4 ウイルスクローンほど 5 - 10%と存在割合が少なくても検出できる結果となった。

PTA である Cell-fusion assay のクローンにおける N4X4 細胞の RLU と GTA である Geno2pheno の FPR との相関関係をみることにした (図 17)。相関係数 $r = -0.5653$ と負の相関を認め $P = 0.0002$ であることより、RLU と FPR の関係に有意な相関があり、N4X4 細胞の RLU が高いほど Geno2pheno の FPR が低い結果となった。また N4X4 細胞の RLU が 10000 以上のクローンは FPR が 20%以下で認められた。これらの結果より、cell-fusion assay が Bulk の状態で DM ウイルスと判定するには N4X4 細胞に反応するクローンの RLU が高ければ

クローンの割合が少なくてよく、N4X4 細胞の RLU が低ければクローンの割合が多く必要とすること、そして、Geno2pheno でみた場合 FPR が 20% のクローンが存在する場合でも DM ウイルスと判定する特徴を持つことが判明した。

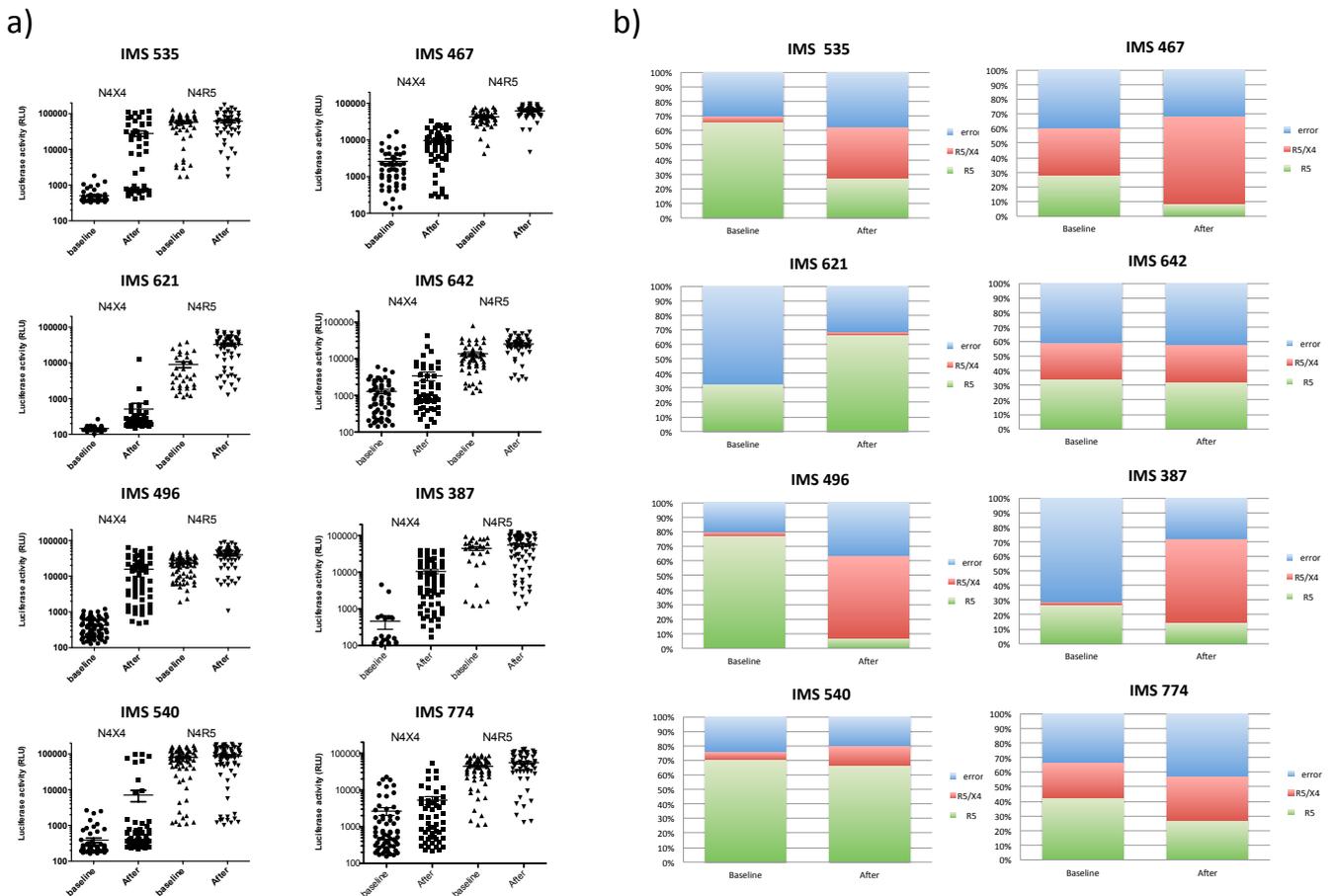


図 14. High throughput cell-fusion assay によるクローン解析

経時的にみた副受容体使用が R5→DM であった 8 名の baseline 及び after (経過観察後) の血漿から得たクローンを High throughput cell-fusion assay で解析した。(a) 各患者の初診時 (pre) と経過観察後 (after) のルシフェラーゼ活性 (RLU)。縦軸：ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸：baseline、初診後 0w (median)；after、初診後 354w (median)。N4X4 細胞 (CXCR4 発現細胞) と N4R5 細胞 (CCR5 発現細胞) は、それぞれ CXCR4 副受容体使用、CCR5 副受容体使用の指標細胞を示す。

(b) 各患者の初診時 (baseline) と経過観察後 (after) の 96 クローンの解析結果の内訳を示す。緑：R5 ウイルスクローン、赤：R5X4 ウイルスクローン、青：Ligation や Transformation が不調であったもの。

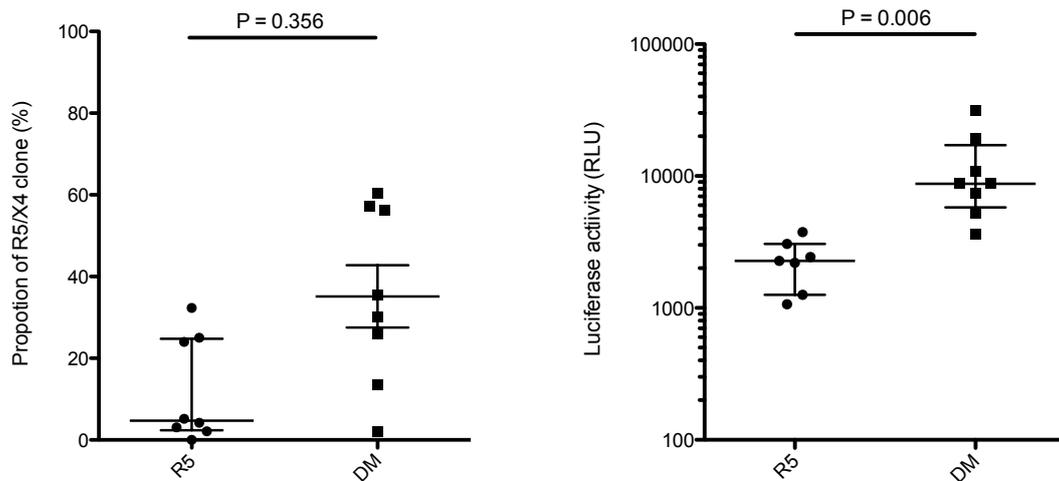


図 15. 経時的にみた副受容体使用が R5→DM であった 8 名それぞれの R5/X4 ウイルスクローンの割合と N4X4 細胞における RLU の比較

a) : 96 クローン中の R5/X4 ウイルスクローンの割合を示す。縦軸 : R5/X4 ウイルスクローンの割合 横軸 : R5 ウイルス (Bulk の baseline の副受容体使用) DM ウイルス (Bulk の baseline の副受容体指向性) b) : 各検体の R5/X4 ウイルスクローンの RLU の median を示す。縦軸 : ルシフェラーゼ活性 (RLU)。横軸 : R5 ウイルス (Bulk の baseline の副受容体使用) DM ウイルス (Bulk の baseline の副受容体指向性)。統計学的解析には Mann-Whitney's U test を用い、有意水準は $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

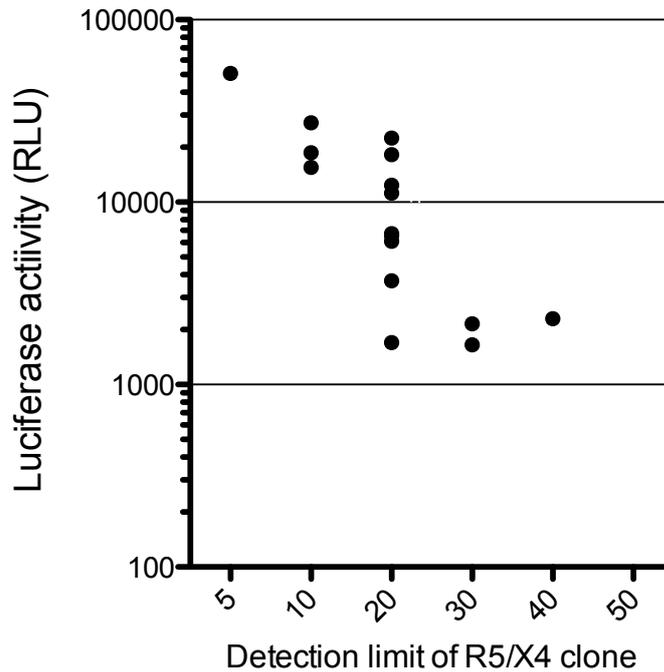


図 16. N4X4 細胞に対して様々な RLU を示す R5/X4 clone の検出限界
R5/X4 クローンとラボラトリーストレインの BaL (R5 ウイルス) をそれぞれ 100/0、99/1、95/5、90/10、50/50、20/80、10/90、5/95、1/99、0.5/99.5、0.1/99.9、0/100 の割合で混合させ図 13 と同様の方法で検出限界を確認した。N4X4 細胞に対して様々な RLU を示す R5/X4 ウイルスクローン 16 個の検出限界をプロットした。縦軸：R5/X4 ウイルスクローンの N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU) の最大値を示す。横軸：N4X4 細胞で検出するのに必要な R5/X4 ウイルスクローンの割合

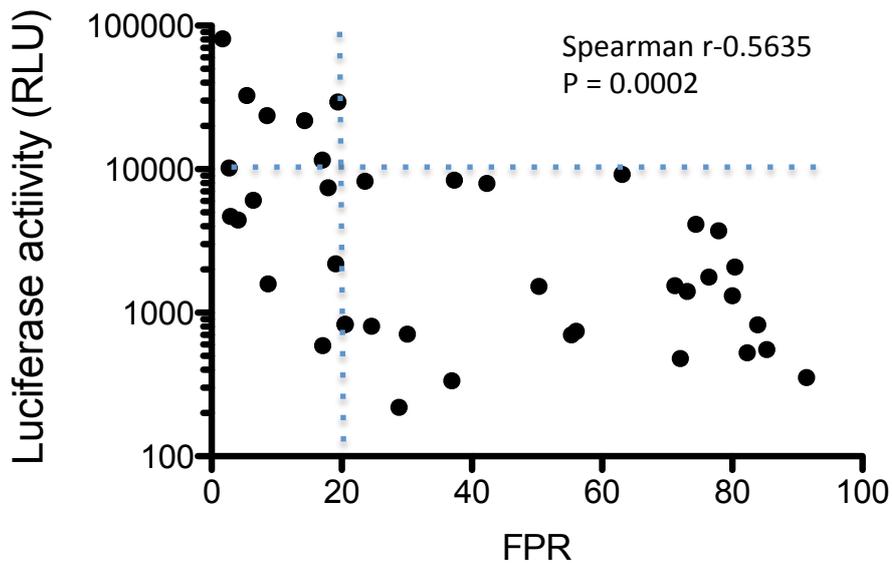


図 17. 細胞融合法による表現型と Geno2pheno 法による遺伝子型との相関関係

縦軸：N4X4 細胞（CXCR4 発現細胞）を指標細胞としたルシフェラーゼ活性（RLU）。同じ V3 のアミノ酸を持つクローンに関しては Median の RLU を用いた。横軸：Geno2pheno 法による FPR 値。

FPR 値：False Positive Rate=V3 領域のアミノ酸シーケンスに基づいて作られたアルゴリズム（Geno2pheno 法）によって計算される「R5 ウイルスを間違えて X4 ウイルスと予測する確率」即ち、FPR 値が少ないほど X4 ウイルスである可能性が高い。

初診後早期の副受容体使用の違いでみた臨床的解析

cell-fusion assay の Bulk の状態での副受容体使用判定の特徴がわかったうえで、患者検体の臨床的解析を行った。初診後早期の副受容体使用の違いでみた患者の臨床的特徴を表 3 に示す。R5 ウイルス群 (15 名) と DM ウイルス群 (25 名) の 2 群間で CD4 陽性細胞数とウイルス量に関して有意差はなかったが、年齢では DM ウイルス群で有意差をもって高く ($p = 0.0371$)、観察期間では DM ウイルス群で有意差をもって短い結果となった ($p = 0.0169$)。経過観察後の CD4 陽性細胞数に両群で差はなかったが、観察期間で DM ウイルス群が有意に短かった事より DM ウイルス群では CD4 陽性細胞数の減少が早く早期に ART 導入となったことが考えられた。そこで両群の CD4 陽性細胞数の減少速度に違いがあるかどうかをみるために、初診後早期の CD4 陽性細胞数から 25%減少した時点を終点として解析した R5 ウイルス群と DM ウイルス群のカプラン・マイヤー曲線の結果を図 18 に示す。その結果、DM ウイルス群において R5 ウイルス群より CD4 陽性細胞数の減少が有意に早い結果となった (Log-rank $p = 0.0155$)。中途打ち切りとなったのは、DM ウイルス群で ART 導入となった一例のみであった。

表3 初診後早期の副受容体使用で分けた患者特性

Characteristic	R5 (n=15)	DM (n=25)	P-value
Age, median (IQR), year	26 (24 – 32)	33 (29– 37)	0.0371
CD4+ T cell count at diagnosis, median (IQR), cells/ μ l	417 (354 – 476)	436 (329 – 590)	0.6751
CD4+ T cell count at ART* initiation or final appearance, median (IQR), cells/ μ l	286 (203 – 341)	247 (211 – 343)	0.6348
Viral load at diagnosis, median (IQR), log copies/ml	4.1 (3.8 – 4.6)	3.8 (3.3 – 4.5)	0.15
Viral load at ART* initiation or final appearance, median (IQR), log copies/ml	4.4 (3.7 – 4.7)	4.6 (3.8 – 5.1)	0.1939
Follow-up period, median (IQR), month	83 (64 – 112)	57 (47 –69)	0.0169

R5とDMの比較で有意差がついたP値を赤で示す

* ART導入患者はR5で12名、DMで22名

統計学的解析にはMann-Whitney's U testを用い、有意水準は $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

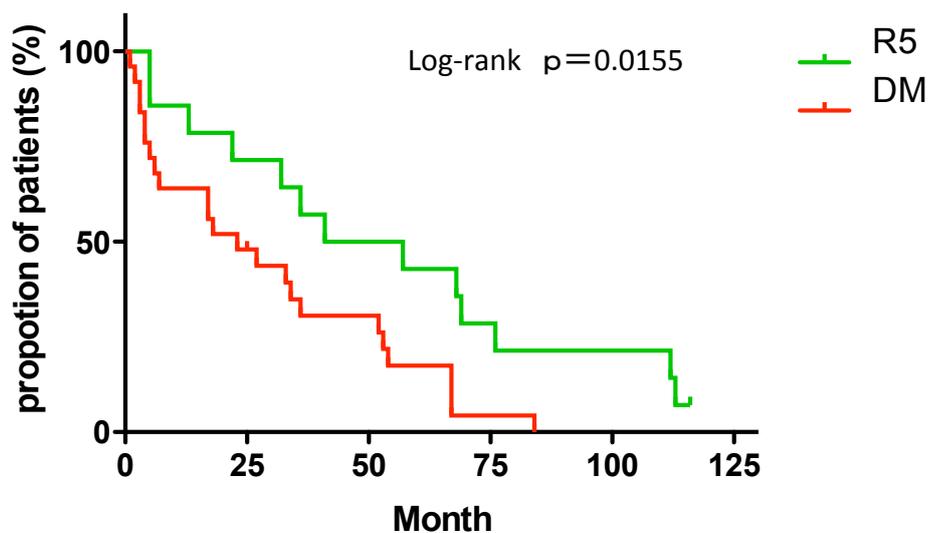


図 18. 経過中の CD4 陽性細胞減少のカプラン・マイヤー解析

初診時の CD4 陽性細胞数から 25%減少した時点をエンドポイントとした。縦軸：初診時の患者数 100%とした患者の割合、横軸：初診時から経過時間（月）。初診時 R5 ウイルス（15 名）を緑色、DM ウイルス（25 名）を赤色で示す。中途打ち切りは DM ウイルス群で CD4 陽性細胞数 25%減少前に ART 導入となった 1 名のみで | で示す。

経時的な変化における R5→R5, R5→DM, DM→DM の臨床的特徴

初診後早期 R5 ウイルス群と DM ウイルス群で CD4 陽性細胞数の減少速度に違いがあったが、経時的に副受容体使用が R5→R5、R5→DM、DM→DM とそれぞれ異なった経過をした 3 群で臨床的特徴に違いがあるかどうかみた結果を表 4 に示す。臨床的特徴で、初診後早期が共に R5 ウイルス群であった R5→R5 と R5→DM 群の比較において有意な差は認めず、R5→R5 群と DM→DM 群の観察期間において DM→DM 群において有意に観察期間が短い結果となった ($p = 0.020$)。その他の指標において有意差は認めなかった。

表4 副受容体使用の変化と臨床的特徴

Characteristic	R5→R5 (n=7)	R5→DM (n=8)	DM→DM (n=25)
Age, median (IQR), year	24 (24 - 30)	29 (25 - 31)	33 (29 - 37)
CD4+ T cell count at diagnosis, median (IQR), cells/ μ l	355 (347 - 415)	468 (416-559)	436 (329 - 590)
CD4+ T cell count at ART initiation or final appearance, median (IQR), cells/ μ l	234 (198 - 305)	293 (252 - 395)	247 (211 - 343)
Viral load at diagnosis, median (IQR), log copies/ml	4.5 (4.3 - 4.7)	3.8 (3.6 - 3.9)	3.8 (3.3 - 4.5)
Viral load at ART initiation or final appearance, median (IQR), log copies/ml	4.4 (4.1 - 4.8)	4.2 (3.2 - 4.6)	4.6 (3.8 - 5.1)
Follow-up period, median (IQR), month	83 (78 - 96) *	81 (58-117)	57 (47 -69) *

統計学的解析にはMann-Whitney's U testを用い、有意水準は $p < 0.05$ を統計学的有意とした。R5→R5とDM→DMの比較で有意差がついたものを*で示す。P=0.020

R5 ウイルスから R5/X4 ウイルスの変化に関する部位の特定

クローン解析の際に *env* V3 のアミノ酸が同じ配列 (CTRPNNNTRKGIQIGPGRAFYTGEIIGDIRQAHC) を持つもので、cell-fusion assay で副受容体使用が R5 ウイルス (16 クローン) と R5/X4 ウイルス (27 クローン) に分かれるクローンを認め (図 19)、V3 以外の領域が副受容体使用の変化に関わる可能性が考えられたため、このクローンの解析を行うこととした。そこで同じ *env* V3 のアミノ酸配列を持つクローンの数を増やす事を目的に初診後早期から経過観察後までの間で保存されている患者検体からプラスミドを作製しクローン解析を cell-fusion assay で行った。その結果、同じ V3 のアミノ酸配列を持つクローンで R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスに分かれるクローン 31 個 (R5 : 10 R5/X4 : 21) が得られ解析に用いた。総計 74 クローンの *env* の全長を遺伝子解析し、Fisher's exact test によって、全アミノ酸配列を解析した結果を表 5 に示す。有意差がついたアミノ酸変異は C1 領域の 051N (アスパラギン) と 051K (リシン) の組み合わせ ($p = 0.026$) と V1 領域の 141A (アラニン) と 141T (トレオニン) の組み合わせ ($p = 0.040$) であった。C1 領域の 051N (アスパラギン) と 051K (リシン) の組み合わせに明らかな差を認めた。そのため、C1 領域の 51 目のアミノ酸をターゲットにポイントミュー

テーションを入れることとした。ポイントミューテーションを入れるクローンは *env* 全長の塩基を近隣結合法で系統樹解析 (図 20) し近接する R5 ウイルスクローン (2278-90) と R5/X4 ウイルスクローン (2278-70) を選んだ。R5 ウイルスクローンの 2278-90 の 51N を 51K に R5/X4 ウイルスクローンの 2278-70 の 51K を 51N になるようにポイントミューテーションを加え、副受容体使用への影響を確認した。その結果は図 21 に示す。R5 ウイルスクローンであった 2278-90 は N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性を認めるようになり R5/X4 ウイルスクローンに変化した。一方 R5/X4 ウイルスクローンの 2278-70 は N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性が N4R5 細胞と比べて大きく低下したが R5/X4 ウイルスクローンのままであった。

Env は gp120 と gp41 のヘテロダイマーが感染細胞表面で三量体を形成しているが、最近その結晶構造が解明されより詳細な分子構造が明らかとなった。その構造を利用し 51 番目のアミノ酸はどのような場所に配置しているのか確認した。その結果を図 22 に示す。Env gp120 の 51 番目のアミノ酸は三量体の内側面に面していて gp41 の近傍に位置していた。また分子表面図よりアミノ酸が N (アスパラギン) から K (リシン) に変わることによって中性から塩基性アミノ酸に変わり、gp41 との相互作用に変化がある可能性が考えられた。

	Env V3 amino acid	cell-fusion assay			Geno2pheno
		R5	R5/X4	Total	FPR (%)
2278	CTRPNNNTRKGIQIGPGRAFYATGEIIGDIRQAHC	16	27	43	50.3
2278 P.....	4	2	6	73.1
2966 N.....	1	2	3	55.3
2966 N..... N.....	5	41	46	63.1
2966 P..... N.....	0	3	3	77.9
2966	. A..... P..... N.....	0	9	9	42.3

*. ***** *****. *****. **. ***

図 19. クローンのエンベロープ V3 のアミノ酸配列と副受容体使用と FPR

背景薄ピンク：患者の初診後早期、背景水色：経過観察後のクローンを表す。
 赤で囲っているものが、同じエンベロープ V3 を持つが、R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスのクローンに分かれたものを示す。

表5 R5からR5/X4の変化に関与する可能性のあるアミノ酸 (Fisher's exact test)

Region	amino acid	R5 with	R5 without	R5/X4 with	R5/X4 without	p-value
C1	051N	21	5	26	22	0.026
C1	051K	5	21	22	26	0.026
V1	141A	23	3	48	0	0.040
V1	141T	3	23	0	48	0.040
V1	142N	18	8	42	6	0.068
V5	468R	1	25	9	39	0.088
V2	199P	5	21	2	46	0.089
gp41	647L	24	2	48	0	0.120
C2	295I	24	2	48	0	0.120
gp41	647I	2	24	0	48	0.120

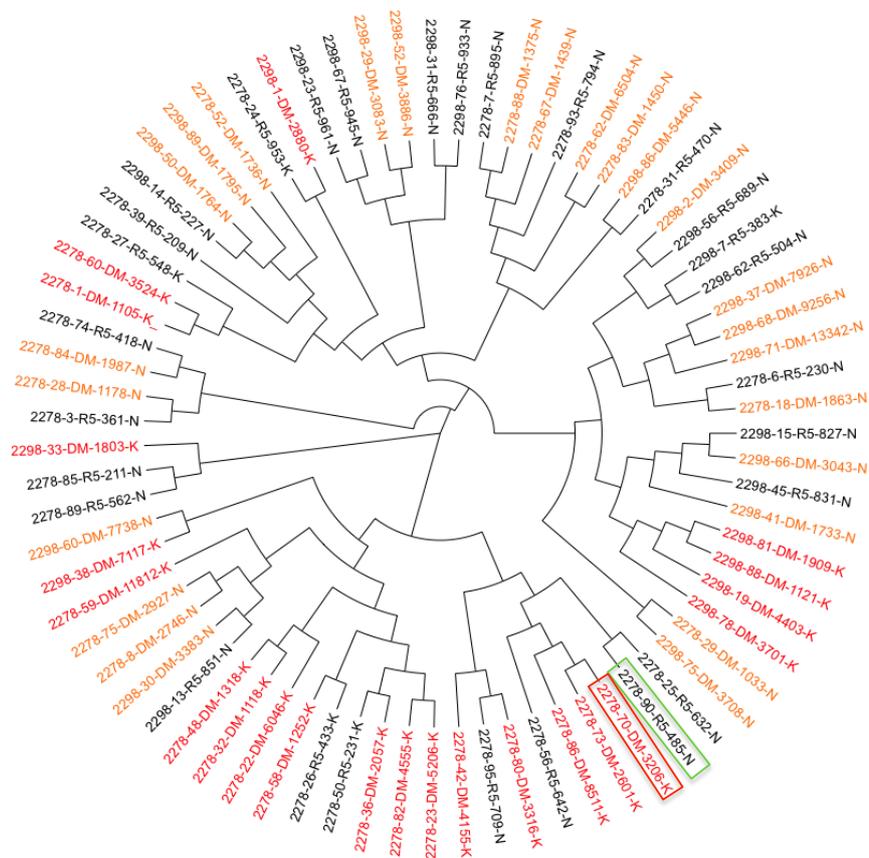


図 20. 同じエンベロープ V3 アミノ酸をもつ 74 クローンのエンベロープ全長の塩基を近隣結合法 (NJ 法) で描いた系統樹

赤は R5/X4 ウイルスクローンで 51K であるもの、オレンジは R5/X4 ウイルスクローンで 51N のもの、黒は R5 ウイルスクローンを示す。ポイントミューテーション対象の R5 ウイルスクローンを緑□、ポイントミューテーション対象の R5/X4 ウイルスクローンは赤□で示す。

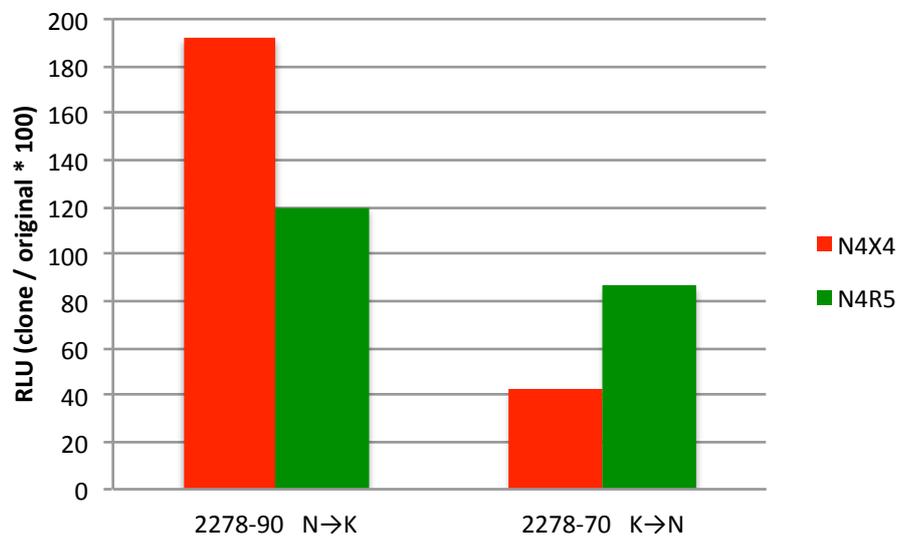
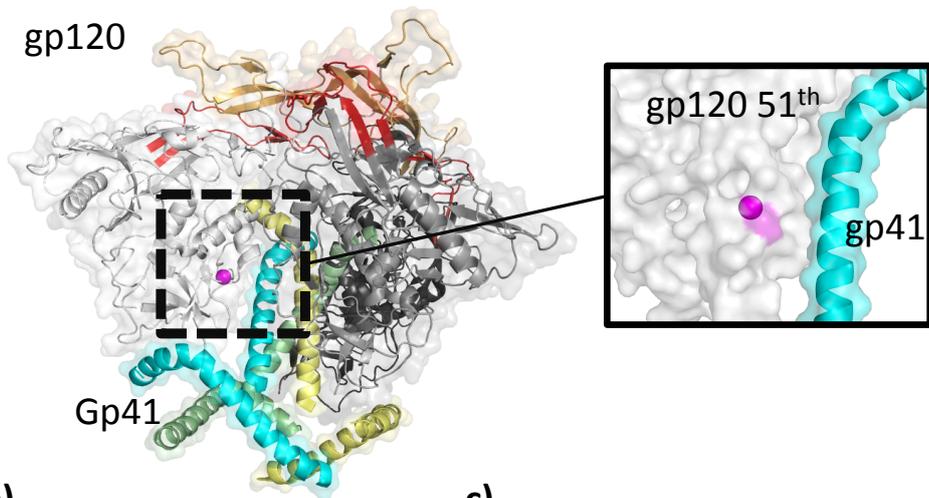


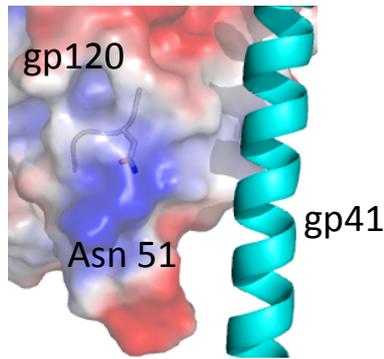
図 21. エンベロープ C1 領域の 51N→K、51K→N のポイントミューテーションによる反応の変化

2278-90 (R5 ウイルスクローン) と 2278-70 (R5/X4 ウイルスクローン)。Y 軸はミューテーション後のクローンのオリジナルクローンの RLU に対する割合を示す。

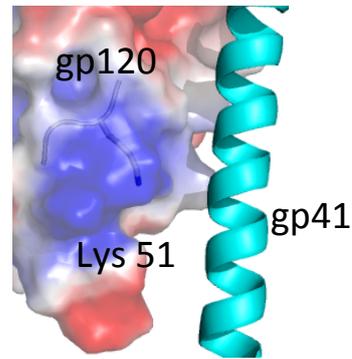
a) env三量体構造



b)



c)



塩基性 酸性

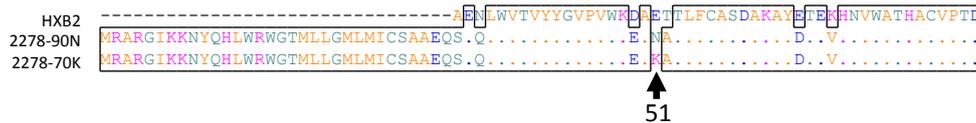


図 22. HIV Env 三量体構造と点変異部位のアミノ酸 (N、K) の分子表面図

a) Env gp120 と gp41 の分子構造。gp120 (濃淡グレー) と gp41 (シアン、イエロー、グリーン) をカートゥーンモデルと分子表面モデルで表す。V1V2 はオレンジ、V3 は赤で表す。gp120 の C1 領域の 51 番目のアミノ酸はマゼンタで表した。b、c) : gp120 分子表面の電荷分布。51 番目のアミノ酸をスティックモデルで表示。分子表面図で、青色は塩基性アミノ酸、赤色は酸性アミノ酸を示す。アミノ酸配列はラボラトリーストレインの HXB2 を同時に示す。

V. 考察

我々の研究室では、P3 施設がなくても副受容体使用を特定する PTA を開発目的に研究をし、DSP を用いた cell-fusion assay を作製した。そして、ラボラトリーストレインを用いた実験では良好な X4 ウイルスの検出感度を得てきた。しかし Bulk の状態では、R5 ウイルスや R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスが混在しており、cell-fusion assay の副受容体使用判定に關与する特徴はわかっていなかった。そこで本研究ではまず Bulk の副受容体使用判定に影響する因子を特定することを目的とするとともに、96 クローンの副受容体使用を一度に決定する方法の開発を目的とした。その結果、High throughput cell-fusion assay を構築し、96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能になった。また、High throughput cell-fusion assay を作製しクローン解析に用いた結果、初診後早期 Bulk で R5 ウイルスと判定された患者クローンの中にも R5/X4 ウイルスクローンが存在し、その数の割合は 0 - 32.3%であった。Bulk の結果をさらにクローンや Deep sequencing などと詳細解析すると、過去にも Bulk の副受容体使用の判定が R5 ウイルスでも R5/X4 ウイルスクローンを認めることは報告されており^{33,34}、クローン解析から我々の Cell-fusion assay が Bulk で R5 ウイルスまたは DM ウイルスと判定する際には、R5/X4 ウイルスクローンの割合と RLU

の違いが関係することが判明した。そしてそれは、R5/X4 クローンの N4X4 細胞の反応性によって違い、N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性 (RLU) が 1000 - 10000 の間の R5/X4 ウイルスクローンでは 20 - 40%の割合が存在すること、N4X4 細胞の RLU が 10000 以上の R5/X4 ウイルスクローンでは 5 - 20%存在することで、Bulk で DM ウイルスと判定するという結果である。また実際に Bulk で DM ウイルスと判定したものは N4X4 細胞の RLU が 10000 以上のクローンを多く認めており、RLU が 10000 以上ということが重要と考えられた。N4X4 細胞の RLU が 10000 以上のクローンは Geno2pheno では FPR が 20%以下で多くみとめられた。これより、Cell-fusion assay で Bulk の副受容体使用判定において Geno2pheno の FPR が 20 %のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM ウイルスと判定する特徴があることがわかった。

臨床において副受容体使用を判定する目的は、CCR5 副受容体阻害薬であるマラビロクの使用の可否を決めるためである。治験で用いられたのは PTA である Trofile[®]のみであるが、過去の治験の再研究において GTA である Geno2pheno のマラビロク使用における有効なカットオフ値が示され、その FPR の値は 5.75%であった³⁵。また、ヨーロッパのガイドラインでは FPR は 10%が推奨されている状況である³⁶。我々の Cell-fusion assay では

Geno2pheno で FPR が 20%のものも DM ウイルスと判定する特徴がありその特徴をもってマラビロク使用の判定に用いた場合、マラビロクの効果が期待できる患者にマラビロクが使用できない状況となる。Cell-fusion assay をマラビロク使用判定に用いるためには、過去の治験検体を用いて再評価するか、治験を行うしかなく、現在の我々の系はマラビロク使用判定には不適合と考えられる。マラビロクの使用判定ではなく、ウイルスの副受容体使用の判定という意味では、Cell-fusion assay は利用可能と思われる。副受容体には CCR5 副受容体と CXCR4 副受容体以外の副受容体も感染に関与しているという報告もあり Cell-fusion assay のレセプター発現細胞である NP-2 細胞に関与が疑われる副受容体を発現させることでマイナーな副受容体の検索にも利用可能である。また High throughput cell-fusion assay にしたことで詳細解析ができるようになり、より早期に R5/X4 ウイルスや X4 ウイルスの出現をモニタリングすることもできるようになった。

次に、今回我々の研究室で作製した Cell-fusion assay が Geno2pheno の FPR が 20%のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM ウイルスと判定する特徴を有することが判明した上で、臨床的解析を行った。初診後早期の患者 40 名のうち DM ウイルスと判定された患者は 25 名 (62.5%) であった。これまでに

CD4 陽性細胞数が低下するにつれて DM ウイルスが多くなることが知られており CD4 陽性細胞数が 200 cell/ μ l 前後の患者の副受容体使用は、50 - 60%が DM ウイルスとなっているという報告が多い³⁷⁻³⁹。一方我々の患者の CD4 陽性細胞数は中央値で 436 cell/ μ l でありながら、過去の報告よりも DM ウイルスの割合は多い結果となった。過去の報告で用いられた副受容体使用の判定方法は、PTA や GTA などを使用しており、Cell-fusion assay の DM ウイルスの検出感度の違いが CD4 陽性細胞数の中央値が 436 cell/ μ l と高値でも DM ウイルスと判定する割合が多くなった原因と考えられた。検出感度が高いと特異度が下がることから考えられたため、N4X4 細胞の反応が非特異反応でないことを確認するため、CXCR4 副受容体阻害薬である AMD3100 を用いた副受容体阻害実験を行ったが、DM ウイルスと判定された検体は全て阻害がかかり副受容体として CXCR4 副受容体を使用していることは確認している。臨床的にみても Cell-fusion assay で判定した R5 ウイルスと DM ウイルスの患者の特徴で観察期間が DM ウイルス群で有意に短かった (P=0.0169) ことから、DM ウイルス群の患者で CD4 陽性細胞数の低下が進み早期に ART 導入となったことが考えられ判定は妥当と考えられた。また、初診後早期 Cell-fusion assay で R5 ウイルスと DM ウイルスと判定した患者の CD4 陽性細胞数の減少速度に違いをみるために初診

後早期の CD4 陽性細胞数から 25%減少をエンドポイントとした R5 ウイルスと DM ウイルス群を比べた Kaplan-Meier 曲線では、DM ウイルス群において R5 ウイルス群よりも CD4 の減少が有意に早い結果となった (Log-rank $p=0.0155$)。これより、DM ウイルスと判定された患者は R5 ウイルスと判定された患者よりも CD4 陽性細胞数の減少が早く、マイナーヴァリエントの存在と、CD4 陽性細胞数の減少速度が相関することが判明し、このことが臨床解析における新しい知見である。DM ウイルスや X4 ウイルスが出現することと CD4 陽性細胞数減少速度や病気の進行速度が早まることには関係があることが知られており⁴⁰⁻⁴² 今回の結果は過去の報告と一致する。これまでの研究では、R5 ウイルス群と DM ウイルス・X4 ウイルス群の両方で CD4 陽性細胞数が観察開始時にすでに有意差があることが多く^{40,43,44}、病期の進行などに関しては CD4 陽性細胞数に差があることが DM・X4 ウイルス群で病期の進行が早い原因と考えられる結果もあるが、今回我々が判定した初診後早期の CD4 陽性細胞数は R5 ウイルス群と DM ウイルス群ではそれぞれ中央値で 417 cell/ μ l と 436 cell/ μ l と有意差がない 2 群の比較となっており、初診後早期の CD4 陽性細胞数の両群での違いによる減少速度への影響は受けない良い比較となった。初診後早期 R5 ウイルス群と DM ウイルス群で CD4 陽性細胞数の減少速度に違いがあったが、

副受容体使用の変化の違いが Cell-fusion assay におけるルシフェラーゼ活性 (RLU) で認められないか検討したが、R5→R5、R5→DM、DM→DM のどの群においても N4R5 細胞の RLU は変化を認めなかった。一方 N4X4 細部の RLU は DM→DM において上昇を認めた。この結果からより CXCR4 副受容体に対する反応性が上昇することが CD4 陽性細胞数の減少に関与した可能性が考えられた。

X4 ウイルスの *env* V3 領域と R5 ウイルスの *env* V3 領域を組み換えた過去の研究により *env* の V3 領域が細胞指向性決定に必要であることがわかり、その後の研究で、ある特定の領域のアミノ酸の変異が細胞指向性に重要であることなども判明している。一方、*env* の V3 領域以外では、V1、V2、C4、gp41 が細胞指向性に関与するという報告もある⁴⁵⁻⁴⁹。今回我々はクローン解析時に同じ *env* V3 のアミノ酸配列を持つもので副受容体使用が異なるクローンが得られ、V3 以外の領域が副受容体使用に関与することが考えられた。総計 74 クローンの *env* の全長を遺伝子解析した結果、*env* C1 領域と V1 領域それぞれ 1 つずつ有意差のついたアミノ酸を認めた。V1 領域の関与は以前より多く報告がある一方、C1 領域に関してはほとんどない。有意差のついた C1 領域の 051N と 051K のポイントミューテーションを加え、副受容体使用への影響を確認した結

果、R5 ウイルスクローンは R5/X4 ウイルスクローンに変化した。一方 R5/X4 ウイルスクローンは R5/X4 ウイルスクローンのままだったが N4X4 細胞のルシフェラーゼ活性は N4R5 細胞に比べて著しく低下した。R5/X4 ウイルスクローンのままであった原因としては、env 全長のアミノ酸で C1 領域以外にもアミノ酸の異なる部位がありその影響があった可能性が考えられた。今回副受容体使用の変化をもたらせた C1 領域の 51 番目のアミノ酸は、分子構造解析より Env gp41 の近傍に位置していた。そして、その位置は、Env の C1 と C5 と gp41 のループ A 領域が相互作用しウイルスが受容体と結合する際の結合時間に関与する場所に存在する⁵⁰⁻⁵³。ただし、C1 領域でも疎水性のアミノ酸が結合時間に関与することが報告されているのみである。51N→51K への変化は疎水性への変化ではないが、中性から塩基性アミノ酸の変化はある。過去の研究では C1 領域の疎水性のアミノ酸にのみ注目されており、塩基性へ変化をもたらす影響は見えていないため何らかの影響がある可能性は否定できない。また、51 番目のアミノ酸が N である場合、その近傍は N-X-S/T (X は任意のアミノ酸残基) であり N 結合型糖鎖の付加がある。一方、51 番目のアミノ酸が N→K になると N 結合型糖鎖の付加はなくなる。N から K に変わる変化は極性と糖鎖付加に変化をもたらすことより、51 番目のアミノ酸が gp41 との相互作用に影響し副受容

体使用の変化に影響する可能性はあると考えられる。C1 領域が副受容体使用の変化に関与するという報告はなく、今回 R5 ウイルスから R5/X4 ウイルスの副受容体使用の違いが Env V3 領域だけでなく C1 領域の違いが関与すること示したことが新しい知見である。

我々の研究には、いくつかの限界がある。第 1 に、患者検体において東京大学医科学研究所附属病院に受診され保存されていた患者検体を用いたため、初診時の患者の CD4 陽性細胞数やウイルス量や年齢など条件を揃えられなかったこと、検体採取が患者の通院間隔由来であるため全ての患者が同じ間隔でフォローできていないことなどの欠点が残った。

第 2 に、今回用いた Cell-fusion assay であるが、HIV の Env を細胞表面に発現させた細胞と、CCR5 副受容体または CXCR4 副受容体を発現させた細胞を融合させ、それぞれの細胞内に発現された DSP が再会合することを利用している。そのため、多くの点で HIV の自然な感染様式と異なっていることがあげられる。まず、Env の発現は、HIV のウイルス粒子表面上では 10 数個と言われるぐらい少量の Env しかないところが、Cell-fusion assay では過剰発現されていること、同様に副受容体も過剰発現されており、さらには CCR5 副受容体と CXCR4 副受容体それぞれの発現量が同じになるように調節できていないこともありそのこ

とが N4X4 細胞での感度の良さとなった可能性は否定できていない。また、細胞融合に至っては、DSP さえ通過できる孔ができれば cell-fusion assay では反応するが、実際の HIV の感染で必要な条件を満たしているか確認できていないことも挙げられる。

第 3 にはクローン解析で判明したことであるが、Bulk として集めたミニプレップ後のプラスミドのうち 35% 程度は反応しないクローンであり Bulk での R5 ウイルスと DM ウイルスの判定に影響があった可能性も考えられる。また、検体でのバラつきも大きく、30% しか反応するクローンがなかった検体もありその場合には DM ウイルスであったはずの検体を R5 ウイルスと判定している可能性も考えられ、系として不完全な部位があるだろう。

今回の研究では、まず High throughput cell-fusion assay を作製し 96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能にしたことで、混在しているウイルスの副受容体使用を詳細解析できるようになり、また High throughput cell-fusion assay は 96 ウェルプレートで全てを行うので、96 ウェル対応の遺伝子解析装置を利用するとそのまま遺伝子解析も行え、PTA だけで GTA の詳細解析が行えるようになったことに大きな意義がある。次に、臨床検体を用いた Cell-fusion assay の Bulk の副受容体使用を High throughput cell-fusion assay

でクローン解析したことで、Cell-fusion assay で Bulk の副受容体使用判定において、Geno2pheno の FPR が 20%のマイナーヴァリエントが存在する場合でも DM ウイルスと判定できること明らかにし、DM ウイルスと判定された患者は R5 ウイルスと判定された患者よりも CD4 陽性細胞数の減少速度が早く、マイナーヴァリエントの存在と CD4 陽性細胞数の減少速度との相関を示したことも臨床的意義がある。そして、R5 ウイルスと R5/X4 ウイルスの副受容体使用の違いが Env V3 領域だけでなく C1 領域の違いが関与することを示したことで、副受容体使用に関する領域に関して新たな知見を示したことに大きな意義がある。

今回の研究で、High throughput cell-fusion assay を構築し 96 検体の副受容体使用を一度に判定することを可能にし、クローン解析に応用したことで、新しい知見を得ることができた。今後 Cell-fusion assay が薬剤スクリーニング、細胞膜融合に必要な因子の検索、他の Env を持つウイルスへ応用など、ウイルスの基礎研究や疫学、臨床解析に利用されていくことが望まれる。

VI. 引用文献

- 1 Centers for Disease, C. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**, 250-252 (1981).
- 2 Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N Engl J Med* **306**, 248-252, doi:10.1056/NEJM198201283060431 (1982).
- 3 Marmor, M. *et al.* Risk factors for Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Lancet* **1**, 1083-1087 (1982).
- 4 Centers for Disease, C. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**, 507-508, 513-504 (1982).
- 5 Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
- 6 Dalgleish, A. G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767 (1984).
- 7 Klatzmann, D. *et al.* T-lymphocyte T4 molecule behaves as the

- receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768 (1984).
- 8 Weiner, D. B., Hubner, K., Williams, W. V. & Greene, M. I. Species tropism of HIV-1 infectivity of interspecific cell hybridomas implies non-CD4 structures are required for cell entry. *Cancer Detect Prev* **14**, 317-320 (1990).
- 9 Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
- 10 Dragic, T. *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673, doi:10.1038/381667a0 (1996).
- 11 Berger, E. A. *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240, doi:10.1038/34571 (1998).
- 12 Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888 (1998).
- 13 Goodenow, M. *et al.* HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J*

- Acquir Immune Defic Syndr* **2**, 344-352 (1989).
- 14 Holland, J. J., De La Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 1-20 (1992).
- 15 Regoes, R. R. & Bonhoeffer, S. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* **13**, 269-277, doi:10.1016/j.tim.2005.04.005 (2005).
- 16 Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* **185**, 621-628 (1997).
- 17 Philpott, S. M. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr HIV Res* **1**, 217-227 (2003).
- 18 Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856-1862 (1996).

- 19 Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377 (1996).
- 20 Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725, doi:10.1038/382722a0 (1996).
- 21 Pasi, K. J. *et al.* The effects of the 32-bp CCR-5 deletion on HIV transmission and HIV disease progression in individuals with haemophilia. *Br J Haematol* **111**, 136-142 (2000).
- 22 Taylor, J. M. *et al.* Causal pathways for CCR5 genotype and HIV progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**, 160-171 (2000).
- 23 Dorr, P. *et al.* Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4721-4732, doi:10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005 (2005).
- 24 FDA approves maraviroc tablets. *AIDS Patient Care STDS* **21**, 702,

- doi:10.1089/apc.2007.9970 (2007).
- 25 Gulick, R. M. *et al.* Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* **359**, 1429-1441, doi:10.1056/NEJMoa0803152 (2008).
- 26 Fatkenheuer, G. *et al.* Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* **359**, 1442-1455, doi:10.1056/NEJMoa0803154 (2008).
- 27 Sierra-Madero, J. *et al.* Efficacy and safety of maraviroc versus efavirenz, both with zidovudine/lamivudine: 96-week results from the MERIT study. *HIV Clin Trials* **11**, 125-132, doi:10.1310/hct1103-125 (2010).
- 28 Whitcomb, J. M. *et al.* Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 566-575, doi:10.1128/AAC.00853-06 (2007).
- 29 Lengauer, T., Sander, O., Sierra, S., Thielen, A. & Kaiser, R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* **25**,

- 1407-1410, doi:10.1038/nbt1371 (2007).
- 30 Beerenwinkel, N. *et al.* Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res* **31**, 3850-3855 (2003).
- 31 Kondo, N., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A. & Matsuda, Z. Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion are inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J Biol Chem* **285**, 14681-14688, doi:10.1074/jbc.M109.067090 (2010).
- 32 Teeranaipong, P. *et al.* Development of a rapid cell-fusion-based phenotypic HIV-1 tropism assay. *J Int AIDS Soc* **16**, 18723, doi:10.7448/IAS.16.1.18723 (2013).
- 33 Mortier, V. *et al.* Frequency and predictors of HIV-1 co-receptor switch in treatment naive patients. *PLoS One* **8**, e80259, doi:10.1371/journal.pone.0080259 (2013).
- 34 Asin-Milan, O. *et al.* Performance of a clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay. *J Virol Methods* **204**, 53-61,

- doi:10.1016/j.jviromet.2014.04.004 (2014).
- 35 McGovern, R. A. *et al.* Population-based sequencing of the V3-loop can predict the virological response to maraviroc in treatment-naive patients of the MERIT trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* **61**, 279-286, doi:10.1097/QAI.0b013e31826249cf (2012).
- 36 Vandekerckhove, L. P. *et al.* European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis* **11**, 394-407, doi:10.1016/S1473-3099(10)70319-4 (2011).
- 37 Moyle, G. J. *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* **191**, 866-872, doi:10.1086/428096 (2005).
- 38 Brumme, Z. L. *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *The Journal of infectious diseases* **192**, 466-474, doi:10.1086/431519 (2005).
- 39 Wilkin, T. J. *et al.* HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a

- CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin Infect Dis* **44**, 591-595, doi:10.1086/511035 (2007).
- 40 Daar, E. S. *et al.* Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis* **45**, 643-649, doi:10.1086/520650 (2007).
- 41 Koot, M. *et al.* Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* **173**, 349-354 (1996).
- 42 Koot, M. *et al.* Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* **118**, 681-688 (1993).
- 43 Waters, L. *et al.* The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis* **46**, 1617-1623, doi:10.1086/587660 (2008).
- 44 Goetz, M. B. *et al.* Relationship between HIV coreceptor tropism and

- disease progression in persons with untreated chronic HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **50**, 259-266, doi:10.1097/QAI.0b013e3181989a8b (2009).
- 45 Boyd, M. T., Simpson, G. R., Cann, A. J., Johnson, M. A. & Weiss, R. A. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J Virol* **67**, 3649-3652 (1993).
- 46 Thielen, A. *et al.* Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *The Journal of infectious diseases* **202**, 1435-1443, doi:10.1086/656600 (2010).
- 47 Carrillo, A. & Ratner, L. Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: role of the V3 loop and C4 envelope determinants. *J Virol* **70**, 1301-1309 (1996).
- 48 Labrosse, B., Treboute, C., Brelot, A. & Alizon, M. Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J Virol* **75**, 5457-5464,

- doi:10.1128/JVI.75.12.5457-5464.2001 (2001).
- 49 Huang, W. *et al.* Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **82**, 5584-5593, doi:10.1128/JVI.02676-07 (2008).
- 50 Julien, J. P. *et al.* Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1477-1483, doi:10.1126/science.1245625 (2013).
- 51 Finzi, A. *et al.* Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell* **37**, 656-667, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.012 (2010).
- 52 Pancera, M. *et al.* Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1166-1171, doi:10.1073/pnas.0911004107 (2010).
- 53 Wang, J., Sen, J., Rong, L. & Caffrey, M. Role of the HIV gp120

conserved domain 1 in processing and viral entry. *J Biol Chem* **283**,
32644-32649, doi:10.1074/jbc.M806099200 (2008).

VII. 謝辞

本研究のために、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を頂いた東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野の岩本愛吉教授（現国立研究開発法人日本研究開発機構科学技術顧問）、岩本愛吉教授の退官により 2015 年 4 月より快く指導教官となってくださりました東京大学医学部附属病院感染症内科の四柳宏准教授に心より感謝申し上げます。また、東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野の立川(川名)愛准教授（現国立感染研究所開発研究センター室長）、細谷紀彰先生には分子生物学実験、細胞実験など多岐にわたりご指導を頂きました。ここに感謝いたします。

東京大学医科学研究所附属病院の藤井毅講師（現東京医科大学教授）、鯉淵智彦講師には、臨床的な観点からのご指導とともに、臨床の時間を割いていただき、被験者への協力依頼、データの解析まで甚大なるご協力を頂きました。

日々の実験や研究、臨床の中で、常に刺激的な議論を頂いた東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野の古賀道子先生、中村仁美先生をはじめとするスタッフ、学生の皆さん、感染免疫内科、ウイルス感染分野、学生の皆さんに感謝いたします。

また、東京大学医科学研究所附属病院の医師、看護師をはじめとするスタッ

フの皆様御協力なしにはこの研究は不可能でした。そして、研究に御協力いただきました、東京大学医科学研究所附属病院の患者皆様に御礼を申し上げます。

最後に研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

大亀 路生