

## (2) 薬剤耐性検査—gag 遺伝子内に検出された挿入変異の意義—

伊部史朗 内海 眞 金田次弘

### THE SIGNIFICANCE OF INSERTION MUTATIONS DETECTED IN THE GAG GENE OF HIV-1

Shiro IBE, Makoto UTSUMI and Tsuguhiro KANEDA

プロテアーゼ (PR) 阻害剤や逆転写酵素 (RT) 阻害剤を組み合わせ使用する多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) は、HIV-1 の複製を強力に抑制し、患者の血中ウイルス量を検出限度以下に維持することを可能とした。しかしながら、これらの薬剤に抵抗性を示す薬剤耐性変異体の出現が、治療の失敗につながる主要な原因のひとつとなっている。これまで、PR 阻害剤耐性や RT 阻害剤耐性に関与する変異は、HIV-1 の gag, PR, RT 遺伝子内に報告されており<sup>1)2)</sup>、われわれは、薬剤耐性変異体の出現が臨床的に疑われた際には、これらの薬剤耐性関連変異の有無を日常的に検査している。その中で、われわれは、HAART 施行中患者の薬剤耐性 HIV-1 が、高頻度に gag 遺伝子内に挿入変異を有していることを見出した。我々は、この gag 遺伝子内の挿入変異が薬剤存在下での HIV-1 の増殖能力や生存能力を向上させている可能性があると考え、挿入変異型 HIV-1 が HAART 施行中に誘導、選択されたのかどうかを調べた。

#### 材料と方法

患者：インフォームドコンセントの得られた未治療患者39名と薬剤耐性変異体を保有していた治療中患者22例を対象にした。HIV-1 薬剤耐性遺伝子型検査：患者の EDTA 加末梢血漿から HIV-1 RNA を精製した。RT-nested PCR により、HIV-1 の gag 遺伝子のコドン425-500, PR 遺伝子のコドン1-99, RT 遺伝子のコドン1-349を含む1539 bp の領域を増幅した。PCR 産物を 1.0% アガロースを用いた電気泳動によって分離し、ゲルから精製した後、ダイレクトシーケンス法によって

塩基配列を決定した。挿入変異を有した HIV-1 が検出された HAART 施行中の患者 8 例のうち、保存血漿検体を利用できた 6 例については、過去にさかのぼって遺伝子解析を行った。

#### 結 果

われわれは、HAART 施行中の患者22例のうち 8 例の患者 (36.4%) の薬剤耐性 HIV-1 が gag 遺伝子の p6 領域内に挿入変異を有していることを見出した。挿入塩基数は 6, 9, 18, または 21 塩基であり、挿入塩基配列の近傍にはそれと同一、または、類似した塩基配列が存在していた (Fig. 1a)。アミノ酸配列をみると、HIV-1 間で保存されている p6 gag タンパク内の“PTAPP”配列が、完全に、または、部分的に複製されていた (Fig. 1b)。挿入変異型 HIV-1 は、39 例の未治療患者のうち 4 例 (10.3%) でも検出された (Fig. 1)。しかし、HAART 施行中患者群における挿入変異型 HIV-1 の出現頻度の方が、未治療患者群のそれよりも有意に高かった (P=0.02)。

Gag 遺伝子内の挿入変異が、抗 HIV-1 治療によって誘導、選択されたのかどうかを調べるために、6 例の患者 (PTH #1, #4, #5, #6, #16, #18) で、挿入変異の存在を過去にさかのぼって調査した (Table 1)。この解析結果は次のように要約できる。1) 3 例の患者 (PTH #1, PTH #5, PTH #18) では、HAART 開始前に既に挿入変異型 HIV-1 のみが存在し、治療中も挿入変異型 HIV-1 のみが検出された。2) 残りの 3 例の患者 (PTH #4, PTH #6, PTH #16) では、HAART 施行前に挿入変異型 HIV-1 と野生型 HIV-1 が混在して

国立名古屋病院 Nagoya National Hospital 臨床研究センター

Address for reprints: Shiro Ibe, Clinical Research Center, Nagoya National Hospital, 4-1-1, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0001 JAPAN

Received March 25, 2003

Accepted September 19, 2003

**a**

B cons.	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAGAGACA...
PTH#1	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCA <b>AACCAACAGCCCCACCAGCAC</b> AGCCAAACAGCCCCACCGGAAGAGAGC...
PTH#4	1	CTTCAGTGCAGACCAGAGCCAA <b>ACAGCCCCGACAGCCCC</b> CGCCAGAGGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
PTH#5	1	TTTCAGAGCAGACCAGAGCCAAACAG <b>CCCCGCCCC</b> TCGGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAA...
PTH#6	1	CTCCAGAGCAGGCCAGAGCCAT <b>CAGCTCCACCAGCCCCAC</b> CAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
PTH#16	1	CTTCAGAGCAG <b>ACCAGAGCCAAACAGCCCC</b> ACCAGAGCCAAACAGCCCCACCAGAGGAGAGCTTC...
PTH#18	1	CTTCAAAGCAGCCCAGAG <b>CCAAACAGCCCCACCAGC</b> CCAAACAGCCCCACCGGCAGAGAGTTTC...
PTH#21	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA <b>CAGCCCCAC</b> CAGCCCCACAGAGGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
PTH#22	1	CTTCAGTGCAGACCAGA <b>ACCAACAGCCCCAC</b> CCAGCCACAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAG...
NP#9	1	CTTCAGAG <b>CAGACCAGAGCCAAACAGCCCC</b> CAGAACAGAGCCAAACAGCCCCACCAGAAGAGAGT...
NP#11	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA <b>CAGCCCCAC</b> CAGCCCCACAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGG...
NP#28	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA <b>CAGCCCCAC</b> CAGCCCCACAGAAGAGAGTTTCAGGTTTGGG...
NP#38	1	CTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA <b>CAGCCCCAC</b> CAGCCCCACAGAAGAGAGTTTCAGGTTTGGG...

**b**

B cons.	1	LQSRPEPTAPPEESFRFGEETTTTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	52
PTH#1	1	LQSRPE <b>PTAPPAQ</b> PTAPPEESFRFGEETTTTPSQKQEMIDKEMYPLTSLRSLFGNDPSSQ	59
PTH#4	1	LQCRPE <b>PTA</b> PTAPPEESFRFGEETATPSQKQEQIDKDLPSASLRSFLGNDPSSQ	55
PTH#5	1	FQSRPEPTAP <b>PP</b> PEESFRFGEETTTTPSQKQEQIDKELYPLASLRSFLGNDPSS	53
PTH#6	1	LQSRPEPS <b>APP</b> APPEESFRFGEETTTTPSQKQEPMDKELYPSASLRSFLGNDPLSQ	55
PTH#16	1	LQSR <b>PEPTAP</b> PEPTAPPEESFRFGEETTPAPSQKQEPIDQELYPLVSLKSLFGNDHSSQ	58
PTH#18	1	LQSS <b>PEPTAPPAPTAPP</b> ESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	55
PTH#21	1	LQSRPEPT <b>APP</b> APPEESFRFGEETTTTPSQKQEQDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	55
PTH#22	1	LQCRPEPTAP <b>PP</b> PEESFRFGEETTTTPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ	54
NP#9	1	LQSR <b>PEPTAPRTEPTA</b> PEESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	56
NP#11	1	LQSRPEPT <b>APP</b> APPEESFRFGEETATPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	52
NP#28	1	LQSRPEPT <b>APP</b> APPEESFRFGEETAAPSQKQEPIDKELYPLASLRSFLGNDP	52
NP#38	1	LQSRPEPT <b>APP</b> APPEESFRFGEETATPSQKQEPINKELYPLASLRSFLGNDP	52

Fig. 1 HIV-1 gag 遺伝子の p6 領域内に検出された挿入変異  
 a) HIV-1 gag 遺伝子 p6 領域の 5' 側の塩基配列. b) p6 gag タンパク質のアミノ酸配列, 挿入された配列をゴシック体で, 挿入配列と同一, または, 類似した配列を下線で示した. PTH は HAART 施行中の患者であり, NP は未治療の患者である. B cons. は, サブタイプ B の共通配列である.

Table 1 Longitudinal analysis of the existence of insertion mutations in the p6 gag region.

Patient No.	Time after HAART (mo)	Viral load (copies/ml)	Antiretroviral drugs <sup>a)</sup>	p6 gag region <sup>b)</sup>	Amino acid mutations associated with drug resistance <sup>c)</sup>	
					Protease	Reverse transcriptase
PTH#1	0	30000	no drugs	INS	V77I	-
	32	4000	AZT, 3 TC, NFV	INS	D30N, A71V, V77I, N88D	D67N, V118I, M184V
	35	1900	AZT, 3 TC, NFV	INS	D30N, A71V, V77I, N88D	D67N, V118I, M184V
PTH#4 <sup>d)</sup>	-4	16000	no drugs	WT/INS	-	L210W, T215Y
	-1	180000	no drugs	WT/INS	-	L210W, T215Y
	4	1400	d 4 T, 3 TC, NFV	WT	D30N	M184V, L210W, T215Y
	8	46000	d 4 T, 3 TC, NFV	WT	L90M	M184V, L210W, T215Y
	9	6800	d 4 T, 3 TC, NFV	INS	D30N	M184V, L210W, T215Y
	15	21000	d 4 T, 3 TC, NFV	INS	D30N	M41L, M184V, L210W, T215Y
	39	23000	d 4 T, 3 TC, NFV	INS	D30N, V77I, N88D	M184V, L210W
PTH#5	-2	140000	no drugs	INS	-	-
	0	180000	no drugs	INS	-	-
	12	8500	AZT, 3 TC, NFV	INS	D30N	M184V
PTH#6	16	4300	AZT, 3 TC, NFV	INS	D30N, N88D	M184V
	0	34000	no drugs	WT/INS	-	-
PTH#16 <sup>d)</sup>	34	8900	AZT, 3 TC, NFV	INS	L90M	M184V
	39	32000	AZT, 3 TC, NFV	INS	L90M	M184V
	-1	46000	no drugs	WT/INS	-	K70R
PTH#18	0	39000	no drugs	WT/INS	-	K70R
	6	2900	AZT, 3 TC	INS	-	K70R, M184V
	31	2300	AZT, 3 TC	INS	-	K70R, M184V
	46	4300	AZT, 3 TC	INS	-	D67N, K70R, M184V, K219Q
	0	190000	no drugs	INS	-	-
PTH#18	12	1100	AZT, 3 TC, SQV	INS	A71V, L90M	M184V
	24	870	AZT, 3 TC, NFV	INS	L10V, A71V, G73S, L90M	M184V
	24	870	AZT, 3 TC, NFV	INS	L10V, D30N, A71V, V77I, N88D, L90M	M184V
	50	1100	AZT, 3 TC, NFV	INS	L10V, D30N, A71V, V77I, N88D, L90M	M184V

<sup>a)</sup> AZT, zidovudine ; 3 TC, lamivudine ; d 4 T, stavudine ; NFV, nelfinavir ; IDV, indinavir ; SQV, saquinavir.

<sup>b)</sup> WT, wild-type alone ; INS, inserted-type alone ; WT/INS, mixed type.

<sup>c)</sup> -, not detected.

<sup>d)</sup> PTH#4 and PTH#16 had previously undergone an antiretroviral therapy with AZT at another hospitals.

いたが、いずれの例でも、治療中に挿入変異型 HIV-1 が選択され、野生型 HIV-1 は消失していた。3) 6 例全例とも治療中に挿入変異型 HIV-1 が野生型 HIV-1 へ転換することはなかった。

#### 考 察

Gag 遺伝子 p6 領域内の挿入変異は、未治療患者からも10.3%という頻度で検出されたことから、gag 遺伝子内のポリモルフィズムのひとつであると考えられる。しかしながら、この挿入変異は、HAART 施行中患者が保有する薬剤耐性 HIV-1 に有意に高い頻度で検出され、さらに、HAART 施行前に挿入変異型 HIV-1 と野生型 HIV-1 が混在していた症例では、治療中に挿入変異型 HIV-1 が選択されていた。このことは、この挿入変異が抗 HIV-1 薬存在下での HIV-1 の増殖能力や生存

能力を向上させていることを示唆している。

#### 文 献

- 1) Doyon L, Croteau G, Thibeault D et al : Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. *J Virol* **70** : 3763-3769, 1996
- 2) Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT et al : Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection-recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* **283** : 2417-2426, 2000

(平成15年3月25日受付)

(平成15年9月19日受理)