



Title	Characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to modified cyclodextrin sulphate (mCDS71) in vitro
Author(s)	森, 治代
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/42975
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	森 治代
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14818 号
学位授与年月日	平成11年5月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to modified cyclodextrin sulphate (mCDS71) <i>in vitro</i> (硫酸化修飾シクロデキストリン(mCDS71)に対する耐性 HIV-1 の 遺伝子解析)
論文審査委員	(主査) 教授 上田 重晴 (副査) 教授 山西 弘一 教授 吉崎 和幸

論文内容の要旨

〔目的〕

プロテアーゼ阻害剤の実用化に伴い HIV/AIDS 治療は大きく進展した。従来の逆転写酵素阻害剤と組み合わせる多剤併用療法により、感染者の血液中のウイルス量を著しく低下・維持させることが可能となった。しかしながら、現在 HIV 感染症の治療薬として用いられているすべての抗 HIV 剤には耐性ウイルスが出現することが知られており、耐性獲得に関与する遺伝子変異部位もすでに明らかにされている。これらとは異なる作用点を持つ抗 HIV 剤として、硫酸化シクロデキストリンに脂溶性基を導入した硫酸化修飾シクロデキストリン(mCDS71)はウイルスと細胞の吸着を強く阻害することが知られている。本研究では、mCDS71に対する耐性 HIV-1 を *in vitro* において作製し、それらにおける遺伝子変異部位を検索することにより mCDS71の作用点を解明しようと試みた。

〔方法ならびに成績〕

1) mCDS71耐性ウイルスの作製

感染性クローン由来である NL432、臨床分離株である KK-1 および A018(AZT 耐性株)の各 HIV-1 株を MT-4 細胞に感染させ、培養液中の mCDS71濃度を漸次上げながら継代培養を行い、mCDS71耐性 HIV-1 を得た。

2) 薬剤感受性試験

HIV-1 を感染させた MT-4 細胞を、段階希釈した薬剤と共に 5 日間培養した後、トリパンブルー染色法により生細胞数を計測し、薬剤の各耐性株に対する50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算出した。

各 mCDS71耐性株は最終的に、それぞれの親株に比較して mCDS71に対し43倍から154倍の耐性を獲得した。しかしながら、薬剤非存在下で同じ期間培養を続けた野性株は親株と全く同等の薬剤感受性を示した。また、吸着阻害剤として知られているデキストラン硫酸に対する耐性ウイルスは、mCDS71耐性ウイルスと互いに交差耐性を示すことが明らかになった。

3) *env* 領域におけるアミノ酸変異の検出

mCDS71がウイルスと細胞の吸着を強く阻害することから、その作用部位はウイルスの *env* 領域であると考えられ

た。そこで、HIV-1 感染細胞中のプロウイルスについて、*env* 領域の中で特にウイルスと細胞の結合に関わるとされている V3、V4 および CD4 binding domain を含む領域を nested-PCR により増幅し、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した。

各耐性株と親株のアミノ酸配列を解析したところ、各株共に変異箇所の増加に伴って強い耐性を獲得する傾向が認められたが、3 種の HIV-1 株に共通するアミノ酸変異は認められなかった。いずれの耐性株においても糖鎖の結合部位である Asn および Ser が関わっている変異が多く検出されることから、新たな糖鎖の結合あるいは結合していた糖鎖が失われたために gp120 の立体構造が変化している可能性が推察された。また、変異の多くは V3 あるいは V4 ループ内、もしくはその近隣に位置しており、これら変異の出現がループ構造に何らかの影響をもたらすことにより mCDS71 に対する耐性を現わす可能性が考えられた。これらの結果から、mCDS71 の作用点はウイルスエンベロープ上に広く分布していることが示唆された。

[総括]

HIV と細胞の吸着を強く阻害する硫酸化修飾シクロデキストリン (mCDS71) に対する耐性 HIV-1 を *in vitro* において作製し、*env* 領域の遺伝子変異部位について解析した。各 HIV 株間に出現した変異に統一性は見られず、mCDS71 に対する耐性獲得に重要と思われる共通の変異部位は決定できなかったが、変異の増加に伴ってより強い耐性を獲得する傾向が認められた。糖鎖の結合部位である Asn および Ser に関連する変異が多く、V3 または V4 ループ内、あるいはその近接部位に多くの変異が認められることから、mCDS71 耐性の獲得には特定のアミノ酸変異よりも、変異の蓄積によって起こりうる gp120 の立体構造の変化が大きく関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

現在用いられているエイズ治療薬は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の逆転写酵素およびプロテアーゼをターゲットとする薬剤に限られており、すでに多くの感染者においてそれらに対する耐性 HIV が検出されていることから、新たな作用点を持つ薬剤の開発が急務となっている。

本研究では、HIV と細胞の吸着を強く阻害する硫酸化修飾シクロデキストリン (mCDS71) の作用機序を明らかにするため、mCDS71 に対する耐性 HIV を作製し、耐性獲得に関わる遺伝子変異部位を解析した。耐性 HIV の *env* 領域をシークエンスした結果、変異の多くは V3 および V4 ループ内、あるいはその近辺に存在し、糖鎖結合アミノ酸であるセリンおよびアスペラギンが関与しているものが多く見られた。このことから、HIV は *env* 領域の立体構造を変化させることにより mCDS71 に対する耐性を獲得することが強く示唆された。V3 および V4 領域におけるアミノ酸変異の多くは、他の吸着阻害剤に対する耐性 HIV にも検出されており、この領域が吸着剤に応く共通するターゲットとして重要な部位であることが明らかとなった。

従来の治療薬と異なる第 3 の作用メカニズムを持つ薬剤として、吸着阻害剤の開発は重要な意義がある。本研究により示された mCDS71 耐性 HIV の出現機序は、今後の薬剤開発に有用な手掛かりを与えるものであり、学位の授与に値すると認める。