

PBMC においては PMA + ionomycin の刺激で増強した long terminal repeat (LTR) promoter の活性が、seminal fluid の添加によって抑えられた (図 6)。この抑制効果は HIV-1 LTR の NF- κ B-binding sites の除去によって失われることから、この部位が seminal fluid がもたらす作用に関与することが推測される。一方 MDM では seminal fluid は HIV-1 LTR の活性を亢進させ、その作用にはやはり NF- κ B-binding sites が関与していると思われた (図 7)。

②臍帯血単核球 (CBMC) における CCR5 の発現と alpha-fetoprotein (AFP) が CCR5 発現に及ぼす影響～母子感染における意義：

CBMC における CCR5 の発現は健康成人 PBMC と比べ顕著に低かった (図 8)。この理由の一つとして、免疫的に未熟な胎児・新生児・乳児では CCR5 の発現が高いことが知られるメモリー細胞 (CD45RO-positive) が少ないことが挙げられる (図 9)。

もう一つの可能性として胎児・新生児血中に大量に含まれる AFP が CCR5 の機能的発現に及ぼす影響を考え、PBMC を AFP の存在下で培養した。ドナーによってばらつきはあるものの、CCR5 の発現が軽度減少する傾向がみられた (図 10)。

Fig. 4 Seminal Fluid Enhances HIV-1 Infection of MDM

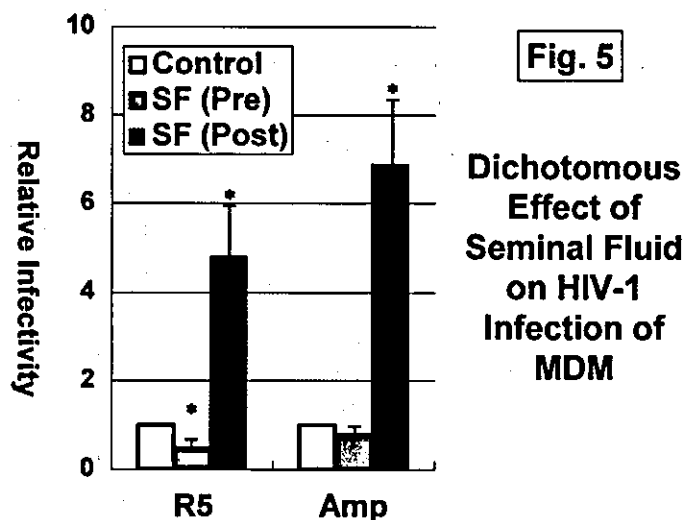
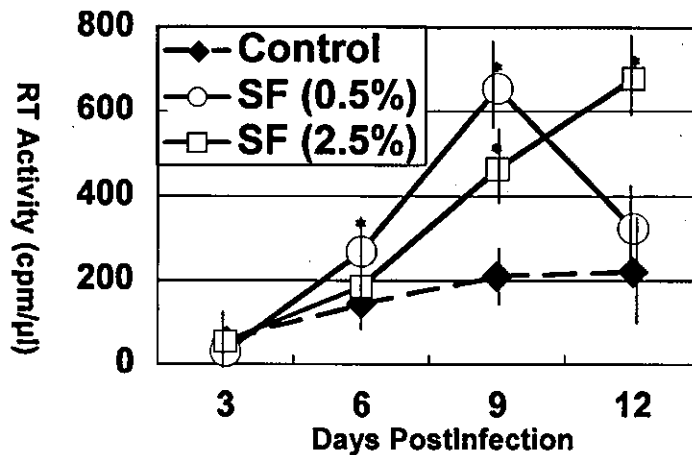


Fig. 6 Seminal Fluid Transrepresses HIV-1 LTR in PBL

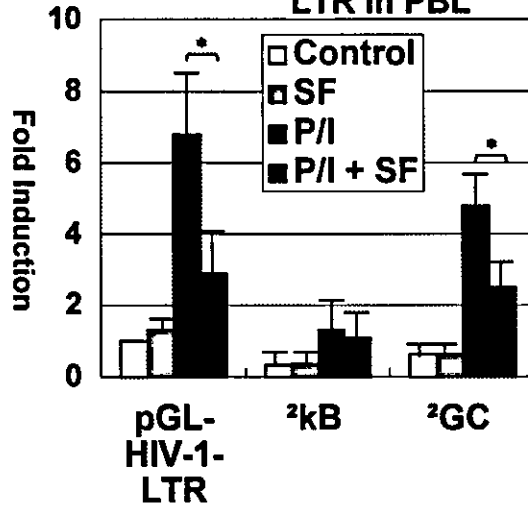


Fig. 7 Seminal Fluid Transactivates HIV-1 LTR in MDM

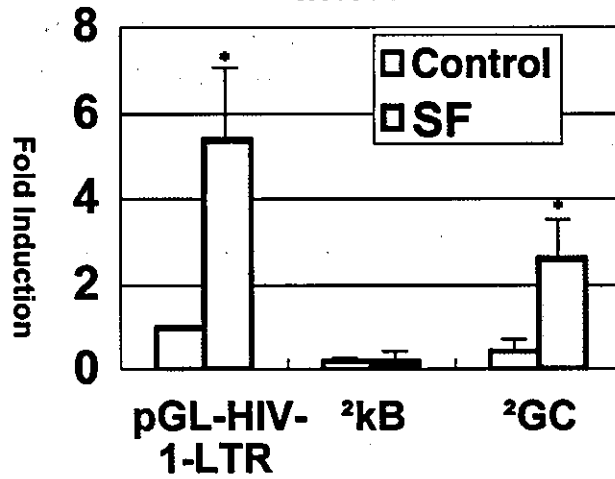
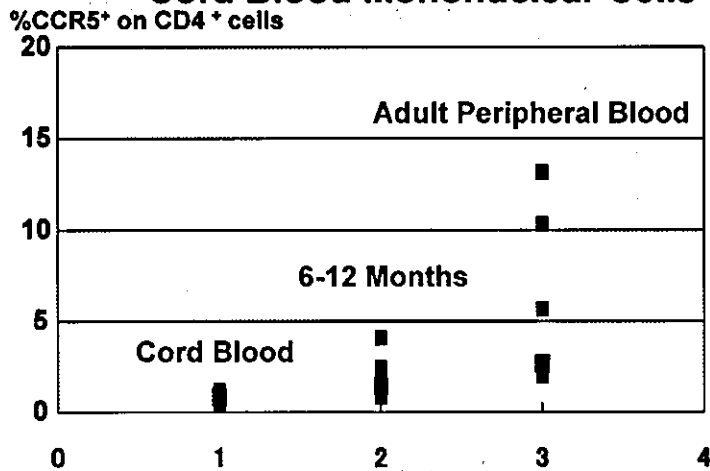


Fig. 8 Lower CCR5 Expression on Cord Blood Mononuclear Cells



2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

① CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響：

HARTT により潜伏状態にある HIV の CD8-depleted PBMC からの発現は刺激なしでは起こらないし、少量の抗 CD3 抗体の刺激だけでは多くの場合不十分であった。しかし RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激は、抑制されていたウイルスの再増殖を促すことがある (図 11)。しかしこの効果は CD8&CD14-depleted PBMC ではみられなかった (図 12) ことから、monocytes / macrophages への作用がこの効果に不可欠であると考えられた。実際、CD14-positive の細胞を含む培養で RANTES による刺激を加えた際には、培養上清中の炎症性サイトカイン (TNF- α など) の産生が増加していることがわかった (data not shown)。

② AFP (CCR5 antagonist)が *in vitro* の HIV 感染に及ぼす影響：

Multiple-round viral replication assays において、AFP は細胞の違い (PBL と MDM) やウイルスの違い (R5-tropic と X4-tropic) に関わらず、HIV-1 感染を抑制した (図 13-15)。Single-round viral replication assays でも同様に感染抑制効果が認められた (図 16-17)。

1)-②でみられたように AFP が CCR5 の発現を軽度抑制することから、当初は感染前に AFP で細胞を処理する必要があると考えたが、single-round viral replication assays では感染後の処理でもウイルス感染抑制効果が認められた。そこで AFP が作用するステップを同定するために、感染初期のステップの評価として感染 24 時間後の細胞内の proviral DNA の定量を行ったところ、AFP は PBL における

Fig. 9

Fewer Memory CD4 T Cells in Cord Blood than in Adult Blood

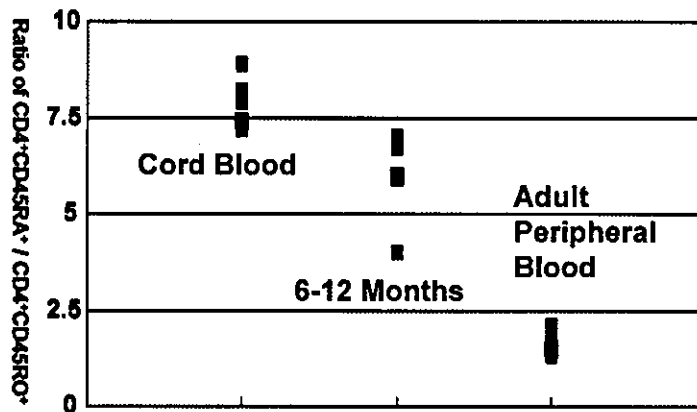
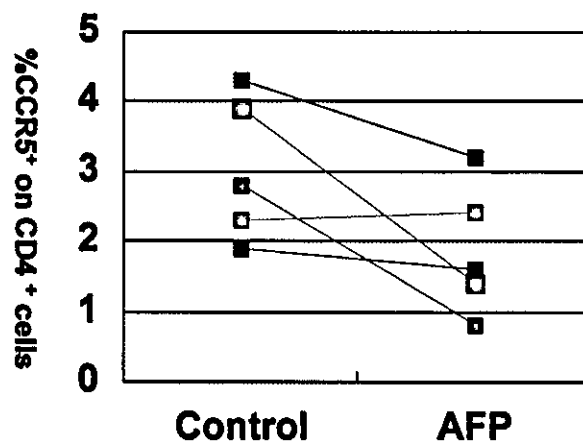


Fig. 10

Downregulation of CCR5 Expression on Adult CD4 Cells by AFP



HIV-1 感染に対する抑制効果は殆どなかったのに対し、MDM では R5-HIV-1 の感染初期効率を著しく減退させた (図 18)。

次に感染後期の重要なステップであるウイルスの転写の効率を、transient expression assays により評

価したところ、PBL においても MDM においても AFP は Tat によって活性化された HIV-1 LTR 活性を抑制した (図 19)。しかし PBL を PMA + ionomycin でさらに刺激した場合は AFP による抑制は明らかではなかった。

Fig. 11 RANTES as a Co-Stimulator that Induces In Vitro Reactivation of HIV-1

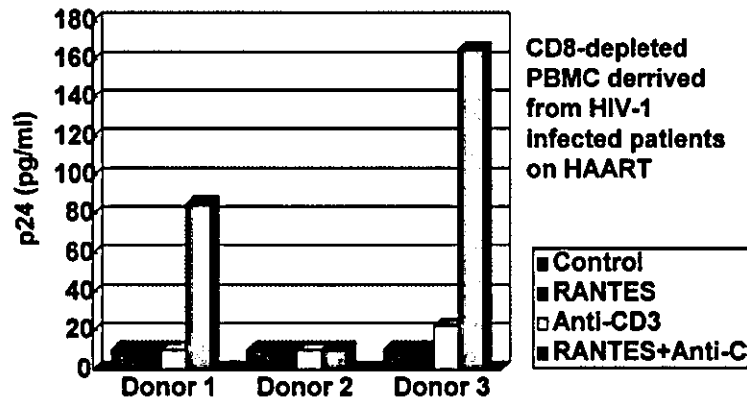


Fig. 12 Requirement of Monocytes in RANTES-Mediated Induction of HIV-1 Infection

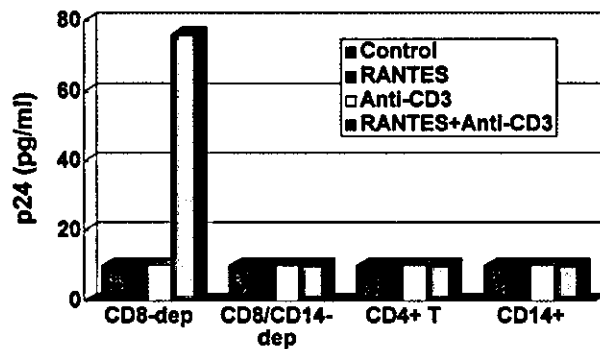


Fig. 13 AFP Suppresses R5-HIV-1 Infection of PBL

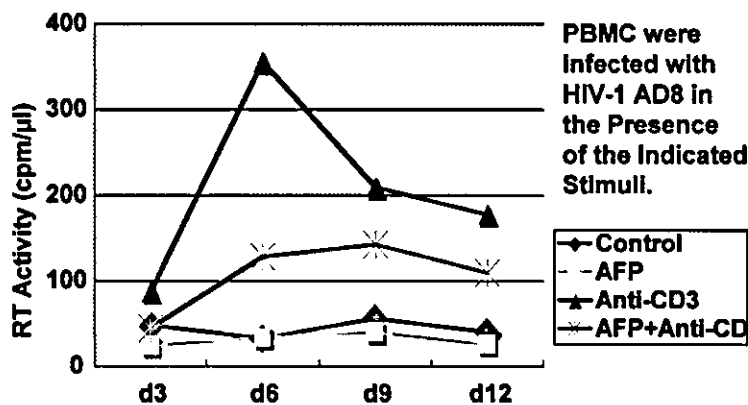


Fig. 14 AFP Suppresses X4-HIV-1 Infection of PBL

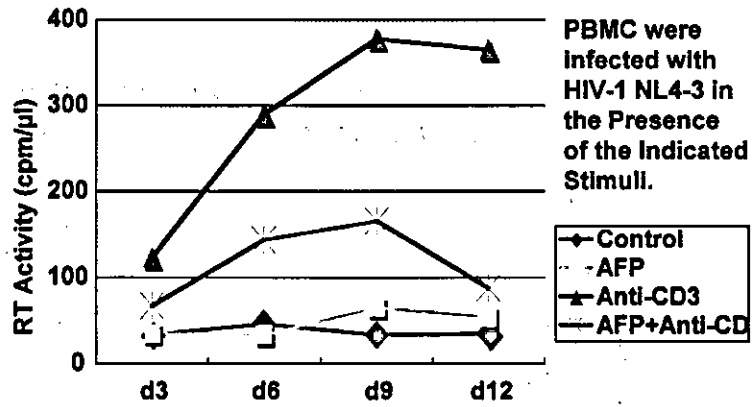


Fig. 15 AFP Suppresses R5-HIV-1 Infection of MDM

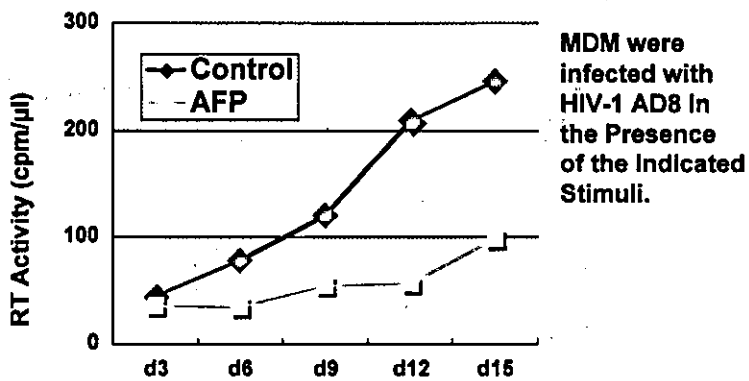


Fig. 16 AFP Suppresses HIV-1 Infection of PBL, Irrelevantly to Env Type

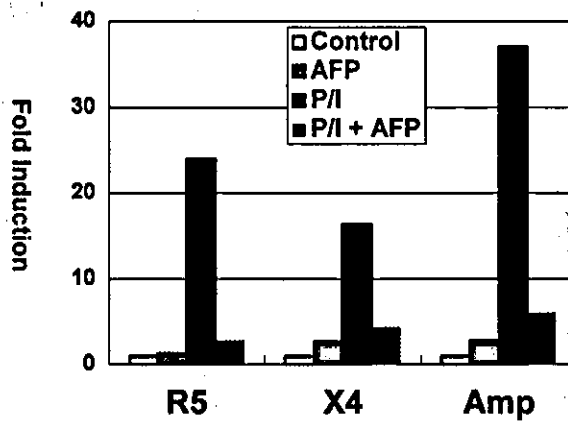


Fig. 17 AFP Suppresses HIV-1 Infection of MDM, Irrelevantly to Env Type

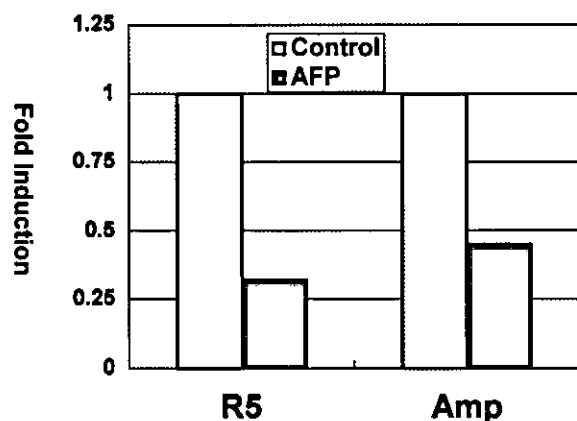
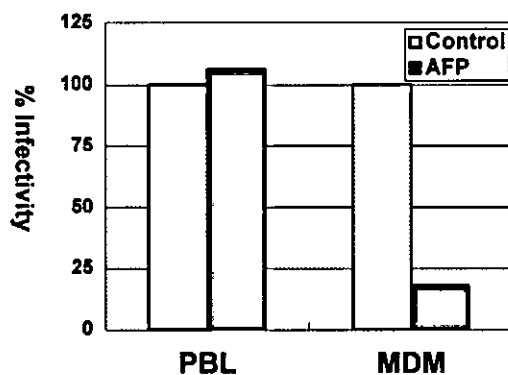
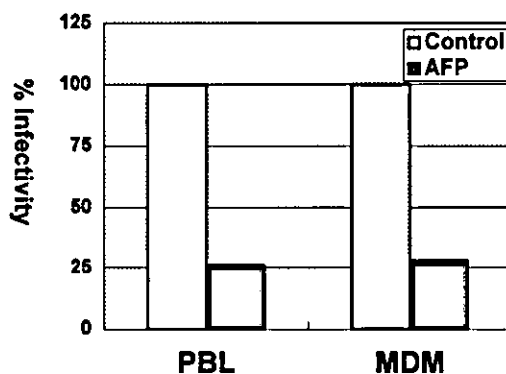


Fig. 18 AFP Suppresses HIV-1 Entry into MDM, but Not into PBL



PBL or MDM were infected with HIV-1 AD8, and harvested for DNA extraction. Real time PCR was performed to quantify proviral loads.

Fig. 19 AFP Downregulates HIV-1 LTR Activity



PBL or MDM were transfected with pGL-HIV-1-LTR and pSV2-Tat.

D. 考察

1) CCR5 の発現とその制御機序

性行為感染や母子感染が生じる環境下で、seminal fluid に含まれる宿主因子や胎児・新生児血液中に大量に含まれる AFP によって CCR5 の発現が調整されうること示した。このような CCR5 の発現の違いは、この分子を標的とする治療法がウイルスの伝播を防ぐ効果に影響を及ぼすかも知れない。ただし上記の宿主因子が HIV-1 感染に与える影響は複雑であり、CCR5 を介した感染初期過程のみでなく、ウイルス転写の過程にも細胞によって異なる影響をもたらす場合がある。Seminal fluid の場合は、そのリンパ球への毒性と、HIV-1 LTR に対する影響がリンパ球では抑制的であるのに対してマクロファージでは促進的であるという二面性から、net effect としてはもしかしたら R5-HIV-1 の性行為感染を助長する方向に進めるものであるかも知れない。

2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

CCR5 を標的とする治療薬がこのレセプターからの刺激を惹起する場合、いったん HIV 感染が成立した細胞ではその発現を促してしまう恐れがあることを示した。その作用はおそらく、monocytes/macrophages を刺激して HIV-1 感染を助長する働きがある炎症性サイトカインを分泌することにあると思われた。

AFP は CCR5 に結合することが以前に報告されており、しかも本来の ligands のような刺激をもたらさないと考えられているため、新たな CCR5 標的因子として抗 HIV-1 的に作用することが期待された。確かに HIV-1 感染を抑えることを *in vitro* の実験で示す事ができたが、その作用は当初考えていたよりも複雑であり実際に *in vivo* でどのような影響を及ぼすものかは明らかでない。

E. 結論

CCR5 の発現や機能を解析する事は、HIV 感染の病態生理の理解を深めるだけでなく、これをターゲットとする治療の効果を高め、副反応を軽減するためにも不可欠である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

論文発表

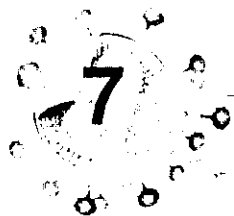
1. Moriuchi, M., Morriuchi, H. Seminal Fluid Enhances Replication of Human T-Cell Leukemia Virus Type I: Implications for Sexual Transmission. *J. Virol.* 78:12709-11 (2004).
2. Moruchi, M., Moriuchi, H. Cell-Type-Dependent Effect of Transforming Growth Factor- β , a Major Cytokine in Breast Milk, on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Mammary Epithelial MCF-7 Cells or Macrophages. *J. Virol.* 78:13046-52 (2004).

学会発表

1. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. Catecholamines inhibit HIV-1 infection through the NF- κ B inactivation. 13th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host. Granada, Spain. June 27-30, 2004.
2. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. A Circadian Transcription Factor DBP Upregulates Expression of CCR5, a Major Co-Receptor for HIV-1. 15th International AIDS Conference. Bangkok, Thai. July 11-16, 2004.
3. Moriuchi, H. and Moriuchi, M. A major milk cytokine TGF- β down-regulates HIV-1 LTR in mammary epithelial cells. 15th International AIDS Conference. Bangkok, Thai. July 11-16, 2004.
4. Moriuchi, M., Moriuchi, H. Impact of alpha-feto-protein on infection with human retroviruses, HIV-1 and HTLV-I. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington DC, USA. October 30 - November 2, 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし。



HAART における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究

分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授）

研究協力者：木村 哲也、濱本理恵子、吉村 和久

（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）

研究要旨

我々は昨年までに、HAART によって長期間にわたり HIV の増殖が抑制できた症例中に、自己由来の HIV を中和する抗体と、HIV 特異的ヘルパー T 細胞が検出できる症例があることを報告した。今年度は、このようなヘルパー T 細胞反応の再構築を分化段階に分けて検討した。中和抗体反応群（液性免疫反応群）と、CD8 に反応が見られる群（細胞性免疫反応群）、およびいずれも見られない群（無反応群）に分け解析すると、主に naive 分画で液性免疫反応群は IFN(-)IL4(+), 細胞性免疫反応群は IFN(+)IL4(-)、無反応群は IFN(-)IL4(-)という違いが見られた。これらのデータは、ヘルパー T 細胞の再構築が TH1 か TH2 のどちらか一方が有意で、どちらかは不十分であることを示す。我々はまた制御性 T 細胞 (T_R) の特異的マーカーである FOXP3 が約半数の HIV 感染症例で過剰発現していることを観察した。この結果は、抗 HIV 免疫の再構築が T_R による抑制を受けている可能性を示唆し、抗 HIV 免疫応答の再構築には、ウイルス増殖の抑制だけでなく、T_R による抑制を回避して、抗 HIV-1 免疫を強化する免疫賦活療法が必要と考えられる。

A. 研究目的

我々は昨年までに、HAART によって長期間にわたり HIV の増殖を抑制できた症例の中に、自己由来の HIV を中和する抗体が出現し、HIV 特異的ヘルパー T 細胞も検出できるようになった症例があることを報告して来た。本年度はこれらの細胞性免疫の再構築についてヘルパー T 細胞の各分化段階での検討を加え、分化の偏りについて考察する。また、多くの症例で、HIV に反応するヘルパー T 細胞の再構築は不十分であるが、この理由のひとつとして、通常は免疫の過剰反応を抑えていると考えられている「制御性 T 細胞 (regulatory T cell; T_R)」の関与が考えられる。我々は、HIV 感染症例 40 症例について T_R の特異的マーカーである FOXP3 の発現量を測定し、HIV に対する免疫再構築における T_R の関与について検討した。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

27 例の HIV 慢性感染症例を対象として、自己由来の HIV に対する中和抗体活性を測定した。臨床分離株；HAART 開始前の血液から末梢血単核球分画 (PBMC) を分離し、CD8⁺細胞を免疫ビーズ法にて除去したあとに抗 CD3 抗体で刺激し、IL2 含有 15%FCS 加 RPMI1640 培地にて 7-10 日培養した細胞培養上澄中のウイルスを臨床分離株として用いた。分離したウイルスが末梢血クワシスピーシスの代表かどうか調べるため、エンベロープ V3 の塩基配列を決定した。中和活性の測定；経時的に採取した患者血漿から精製した IgG を用いて、中和活性を測定した。50 μl の分離ウイルス (500TCID₅₀) を 50 μl の IgG サンプル (1mg/ml) と混合し、標的細胞である、MAGI/CCR5 細胞に加え、48 時間培養後、beta-

galactosidase 活性を galactostar system を用いた測定した。それぞれの実験で 5 種類の健常人由来の IgG サンプルをコントロールとして用い、有意差を検定した。HIV 特異的 T 細胞反応の測定；PBMC を HIV 抗原または CMV 抗原刺激後 20 時間培養し、細胞内に産生される IL2, IL4, rIFN を intracellular cytokine staining (ICC)にて解析した。HIV 特異的ヘルパー T 細胞の再構築に関して各分化段階での評価には CD4 陽性細胞を CD45RA 抗原と CCR7 の発現で Naïve (TN; CD45RA⁺CCR7⁺)、Memory (TM; CD45RA⁻CCR7⁺)、Effector Memory (TEM; CD45RA⁻CCR7⁻)、Effector (TE; CD45RA⁺CCR7⁻) に分画し、それぞれの分画で抗原刺激に反応して産生される IL2、IFN γ および IL4 を細胞内染色し、LSRII (BD) を用いて検討した。FOXP3 の発現量の定量；PBMC より抽出した Total RNA (0.5 μ g) から cDNA を生成した。これを鋳型とし Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents (Applied Biosystems) を用いて、FOXP3 mRNA 及び 18S rRNA の PCR 反応を Applied Biosystems PRISM 7000 Sequence detection system にて検出した。それぞれのサンプルの比較のため 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} ($\Delta\Delta$ Ct method) を用いて計算し、更にその数値 (fold induction) をノーマライゼーションのためそれぞれの患者の CD4:8 ratio にて除した。制御性 T 細胞 (regulatory T cell; T_R) 活性の測定；ヘパリン加血より遠心法にて PBMC を分離し、一部を MACs beads と column にて CD25⁺ depletion を行った。PBMC と CD25⁻ PBMC のそれぞれを X-vivo2.1ml に再浮遊させ、PBMC を分離する際に採取した autologous plasma 0.7ml と anti-CD28mAb (1.2 μ g/ml, Pharmingen) を加えた。3well に 0.8ml ずつ分注しそれぞれの well に stimulator として X-vivo 100 μ l (negative control) または CMV (1 μ g/ml), JRFL antigen (100ng/ml p24) を加え、37 °C, 5%CO₂ で 6 時間 incubation を行った。開始 2 時間で Breferrdin A (10 μ l/ml) をそれぞれの well に加えた。Incubation 終了後、細胞表面 (CD4, 死細胞)、細胞内染色 (IFN γ , IL-2) を行い FACS Calibur にて分析した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し、解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果

1) 自己由来 HIV に対する中和抗体活性とヘルパー T 細胞に関する研究

我々は、自己由来臨床分離株に対する、血漿中の中和活性の、HAART 療法開始前後における変動について検討した。27 例中 4 例では、HAART 開始時から有意な中和活性を認め、治療中も高い中和活性が保たれた。残りの 23 例中 16 例は IgG 濃度 500mg/ml の濃度で、有意ではあるが弱い (40%以下) 中和活性をもつ症例であった。これらの中から 2 年の有効な治療経過の中で 5 例に自己由来の分離株に対する中和活性の増強が認められた。一方、7 例では HAART 開始時点で中和活性を認めなかったが、3 例では HAART 開始 12 ヶ月以降で有意な中和活性の上昇が認められた。これらの結果を表 1 に示す。このように、観察期間を延長することにより、自己由来 HIV に対する液性免疫応答が回復する症例が増加した。これらの症例の臨床経過を詳細に解析すると、HIV に対する免疫応答の再構築がみられた症例の中には HAART 開始時の CD4⁺ 細胞数が低く (< 200/mm³) と低いレベルの HIV-RNA の blips がみられる症例があった。

我々はこれらの症例の HIV 特異的ヘルパー T 細胞反応を検討した。中和抗体が弱いと検出されない 23 例の中から中和抗体が再構築された 8 例 (REC 群) と再構築が認められない 15 例 (CTRL 群) を比較した。HIV 感染症由来の抹消血単核球を HIV 抗原または CMV 抗原刺激後 20 時間培養し、細胞内に産生される IL2 および rIFN を FACS で解析した。HIV 抗原で刺激した場合、中和抗体が再構築された 8 例ではコントロール群に比べて特異的ヘルパー T 細胞有意に増加していた。一方、CMV 抗原に対する反応は両群間に差がなかった (図 1)。これらのデータは、一部の症例では、有効な HAART の継続によって、HIV に対する中和抗体と HIV 特異的ヘルパー T 細胞の再構築がおこることを示すと考えられる。

我々はこれらの中和抗体の増加した症例のうち 7 例と、中和に変化のなかった 15 例中 10 例について、ヘルパー T 細胞の各分化段階における反応性について検討した。図 2 に示すように CD4 陽性細胞を CD45RA 抗原と CCR7 の発現で Naïve (TN; CD45RA⁺CCR7⁺)、Memory (TM; CD45RA⁻CCR7⁺)、Effector Memory (TEM; CD45RA⁻CCR7⁻)、Effector

(TE; CD45RA+CCR7-) に分画し、それぞれの分画で抗原刺激に反応して IL2 産生が検出できるかどうか測定し、さらに IL2 産生+または-のそれぞれの分画について IFN γ および IL4 産生を検討した。解析に際し、CD8 陽性細胞のサイトカイン産生も測定し、中和抗体の再構築の見られなかった症例を CD8 陽性細胞反応が観察される群[N. Ab(-), CD8 (+), n=7]と無反応群[N. Ab(-), CD8 (-), n=3]の二つに分類

した (図 3A)。total の CD4 陽性細胞の反応性を図 3B に示す。中和抗体再構築群[N. Ab(+)]は CMV に対する免疫反応は N. Ab(-), CD8 (-)群に類似し、HIV 抗原に対する反応は IL4 に対する反応以外では N. Ab(-), CD8 (+)群に同等であった。各分化段階での変化に関しては、最もサイトカイン産生細胞の頻度が高い TEM 分画では、IFN γ 産生が N.Ab(-),CD8 (+)群に有意に強くみられた以外にはこの群との違

表 1. HAART 開始後の自己由来ウイルスに対する中和抗体

HAART開始前の 中和抗体活性(全27症例)	HAART療法中の中和抗体 の活性
High 4/27	High 4/4
Low 16/27	*Low 11/16 **Increased 5/16
No activity 7/27	*No activity 4/7 **Increased 3/7

*No difference in neutralizing activity .
**Increase in neutralizing activity .

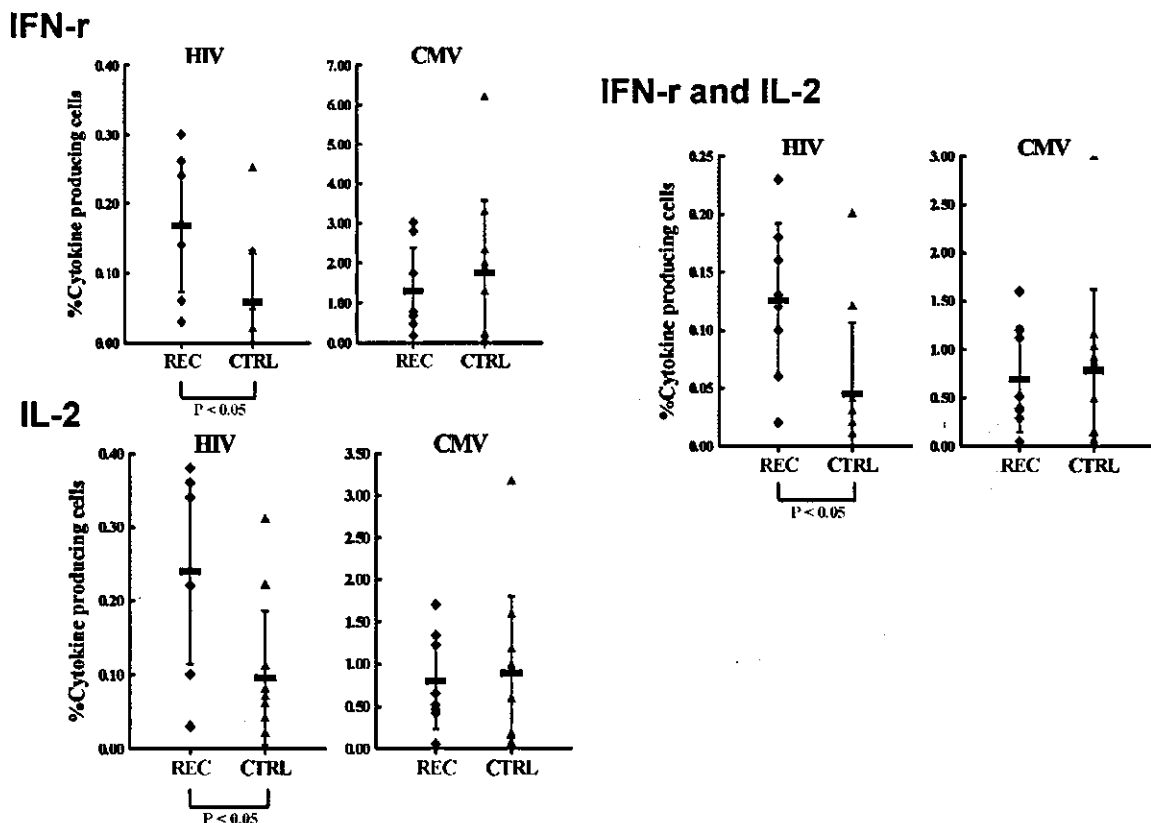


図 1. 中和抗体活性増加症例 (REC) における HIV 特異的ヘルパー T 細胞活性の再構築

自己由来の臨床分離株に対する中和抗体活性の増強が見られた症例では、HIV 抗原に反応してサイトカインを産生するヘルパー T 細胞の活性が有意に増加している。

いはなかったが、TM では IL2 と IL4 の産生が強く見られた (data not shown)。一方、頻度は少ないが TN 分画では明らかな違いが観察された (図 4)。すなわち、N. Ab(-), CD8 (+) 群では IFN γ 産生が見られ

るのに対し、他の 2 群では IFN γ の産生が見られなかった。一方、IL4 の産生に関しては、低レベルだが、中和抗体再構築群にのみ観察された。

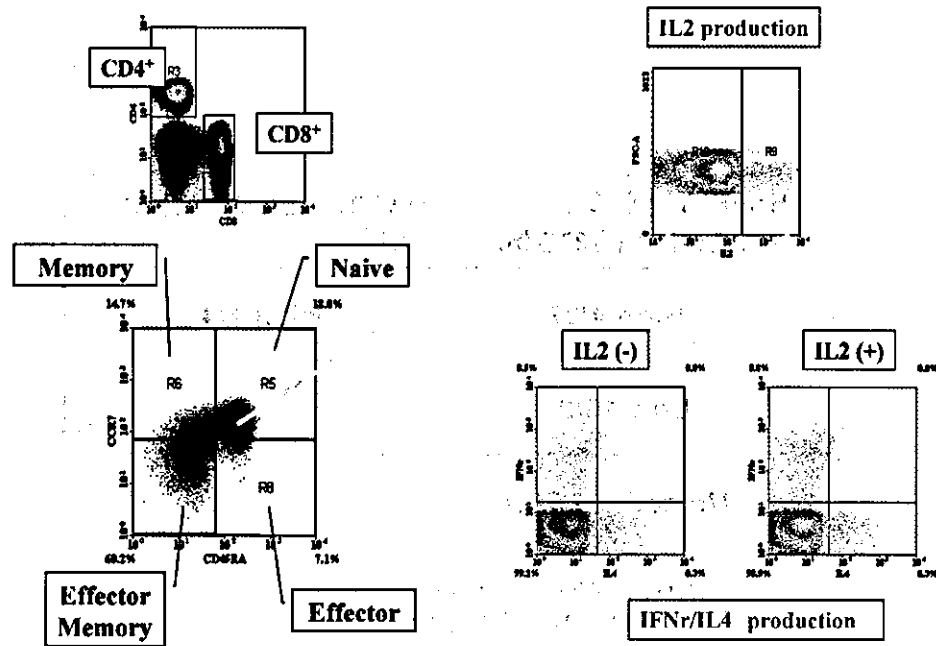


図 2. 各分化段階における抗原特異的 CD4⁺ T 細胞反応の測定

HIV 特異的ヘルパー T 細胞の各分化段階での評価には CD45RA 抗原と CCR7 の発現を用いた。Naïve(TN;CD45RA⁺CCR7⁺), Memory(TM;CD45RA⁺CCR7⁺), Effector Memory (TEM;CD45RA⁺CCR7⁻), Effector (TE;CD45RA⁺CCR7⁻)に分画し、それぞれの分画で抗原刺激に反応して産生される IL2, IFN γ および IL4 を細胞内染色し、LSR II (BD)を用いて検討した。

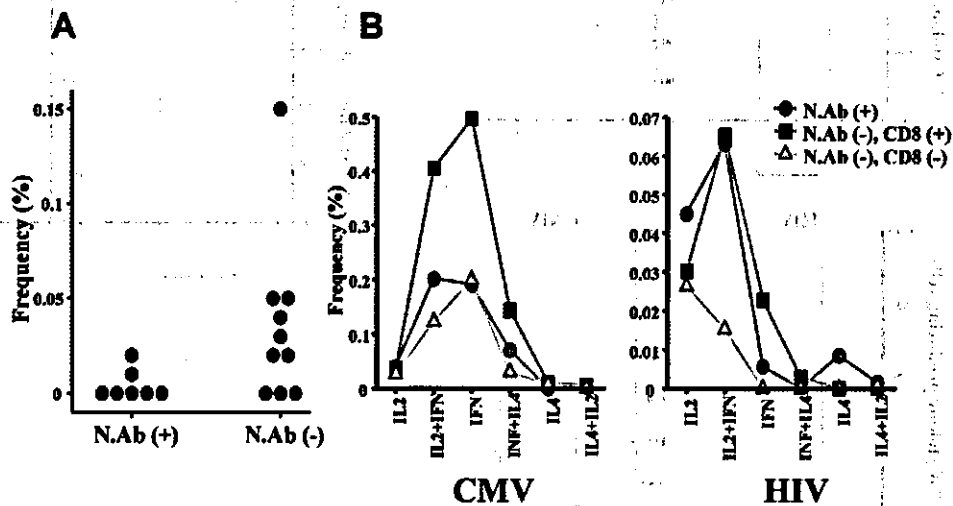


図 3. 抗原特異的に IFN- γ と IL-2 を産生する CD4⁺ T 細胞の頻度

A;CD8 陽性細胞のサイトカイン産生も測定し、中和抗体の再構築の見られなかった症例を CD8 陽性細胞反応が観察される群 [N. Ab(-), CD8 (+), n=7]と無反応群 [N. Ab(-), CD8 (-), n=3]の二つに分類した。図 2B ; total の CD4 陽性細胞の反応性。中和抗体再構築群[N.Ab(+)]は CMV に対する免疫反応は N. Ab(-), CD8 (-)群に類似し、HIV 抗原に対する反応は IL4 に対する反応以外では N.Ab(-), CD8 (+)群に同等であった。

2) HIV に対する制御性 T 細胞の解析

これまで、HIV に対するヘルパー T 活性の再構築を検討してきたが、多くの症例で、ヘルパー T 細胞の再構築は不十分であることがわかった。この理由のひとつとして、通常は免疫の過剰反応を抑えていると考えられている「制御性 T 細胞 (regulatory T cell; T_R)」が関与している可能性が考えられる。我々は、HIV 感染症例 40 症例について T_R の特異的マーカーである FOXP3 の発現量を測定し、HIV に対する免疫再構築における T_R の関与について検討した。対象とした症例は表 2 に示すように、HAART 療法中の 32 症例に加えて無治療の 8 例を用いた。

FOXP3 の発現量は、PBMC から RNA を抽出し、TaqMan probe を用いて、real time PCR を用いて行

った。CD8 細胞の多い症例では、CD8 細胞由来の RNA のためにデータが希釈される恐れがあることから、相対的な発現量として、CD4/CD8 比で割った数字を用いて比較した。図 5A に示すように、HIV 非感染コントロールに比較して、HIV 感染症例では FOXP3 の発現は有意に増加していた。一方、T_R の細胞表面マーカーである、CD4⁺, 25⁺ の頻度には有意差を認めなかった (図 5B)。各症例を、それぞれの FOXP3 発現量の少ない順に並べたところ 21 例で、16 名の HIV 非感染コントロールの平均 + 1SD 以上であった (図 6)。これらの症例の特異的 T_R 活性を調べた。PBMC を *in vitro* で刺激する実験系に平行して、CD25 陽性細胞を磁気ビーズで除去した CD25-PBMC を抗原で刺激し IL2 および IFN γ の産生の増加を観察した。FOXP3 がコントロール

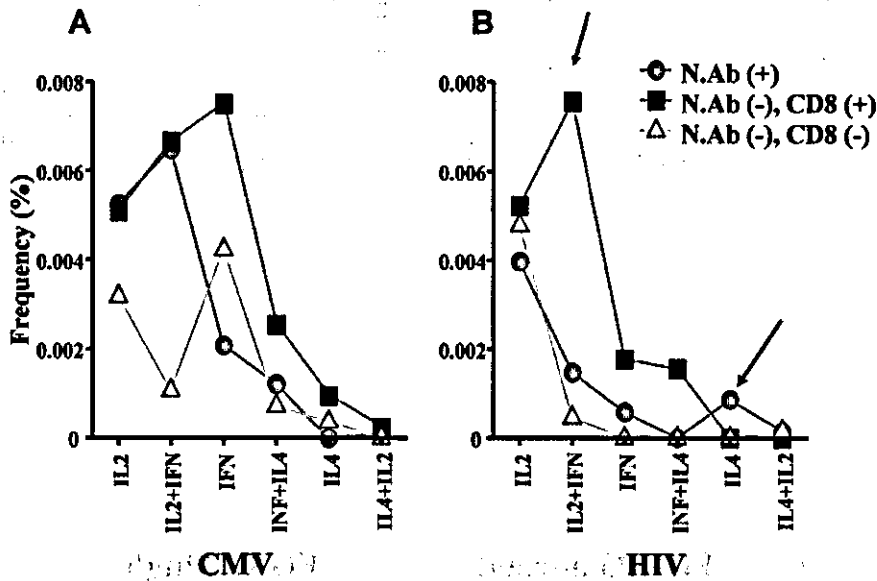


図 4. Naive 分画におけるヘルパー T 細胞活性

A; CMV 抗原に対する反応、B; HIV 抗原に対する反応。N. Ab(-), CD8 (+) 群では IFN γ 産生が見られるのに対し、他の 2 群では IFN γ の産生が見られなかった。一方、IL4 の産生に関しては、低レベルだが、中和抗体再構築群にのみ観察された。

表 2. 制御性 T 細胞の解析症例 (n=40)

	CD4:CD8 ratio	CD4 count	%CD4 ⁺ CD25 ⁺ in PBMC	HIV RNA(copies/ml)	
				< 50	> 50
Under treatment (N=32)				31	1
Mean ± SD (range)	0.83 ± 0.53 (0.16-2.4)	580 ± 258 (100-1071)	3.90 ± 2.10 (0.56-8.41)		
No treatment (N=8)				1	7
Mean ± SD (range)	0.81 ± 0.34 (0.39-1.43)	527 ± 260.5 (255-941)	4.57 ± 1.93 (1.51-6.21)		

と同等であった症例群 (FOXP3 normal 群) と FOXP3 がコントロールより有意に高値であった症例群 (FOXP3 high 群) で比較すると、どちらの群でも CD25 陽性細胞を磁気ビーズで除去した CD25-PBMC を刺激した場合のほうが IFN γ 産生の有意な増加がみられるが、その増加率を比べると、HIV 抗原で刺激した場合にのみ FOXP3 high 群のほうが、

FOXP3 normal 群に比較して有意に IFN γ の産生量の増加が見られた(図 7)。一方、IL2 産生に関しては、FOXP3 high 群と normal 群間に有意差を認めなかった。これらの結果は HIV 感染症例に観察される FOXP3 の過剰産生が主に HIV に対する IFN γ 産生性のヘルパー T 細胞制御のために起こっている可能性を示唆する。

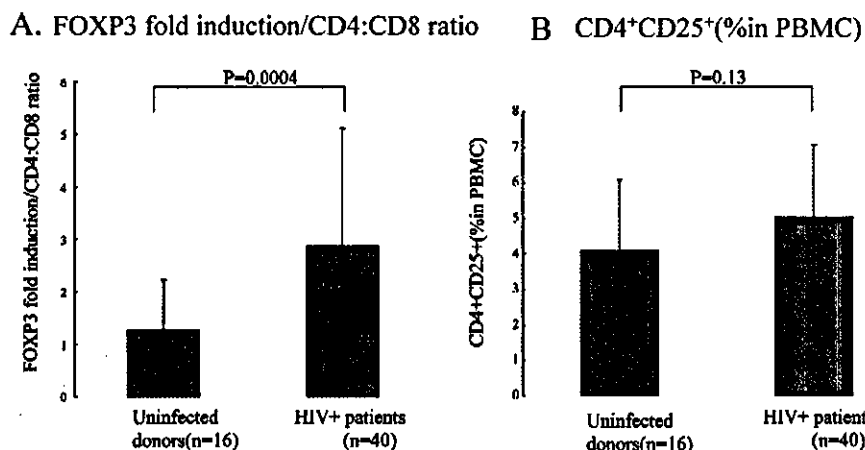


図 5. HIV 感染症例では FOXP3 の転写量が多い

HIV 感染症例 40 人及びコントロール 16 人の PBMC 中の FOXP3 mRNA 発現量を real time RT-PCR 法を用いて測定した。FOXP3 mRNA expression はコントロールと比較し HIV 患者にて有意に高い数値であった。PBMC 中の CD4+CD25+ の陽性率には 2 群間で有意差は見られなかった。

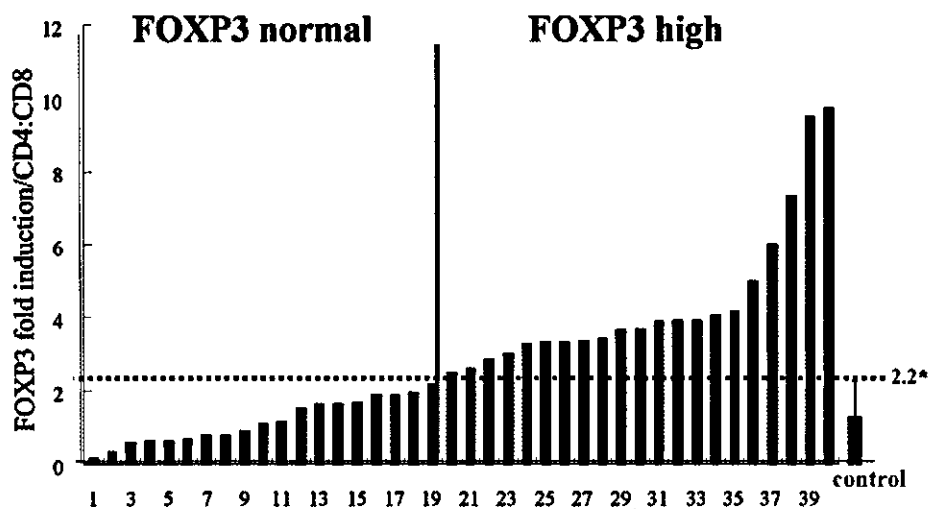


図 6. HIV-1 感染症例における FOXP3 mRNA の発現

40 人の HIV 感染症例について制御性 T 細胞に発現する FOXP3 mRNA をリアルタイム PCR で検討した。21 検体は非感染コントロール例に比較して Mean+SD 以上であった (FOXP3 高発現群)。

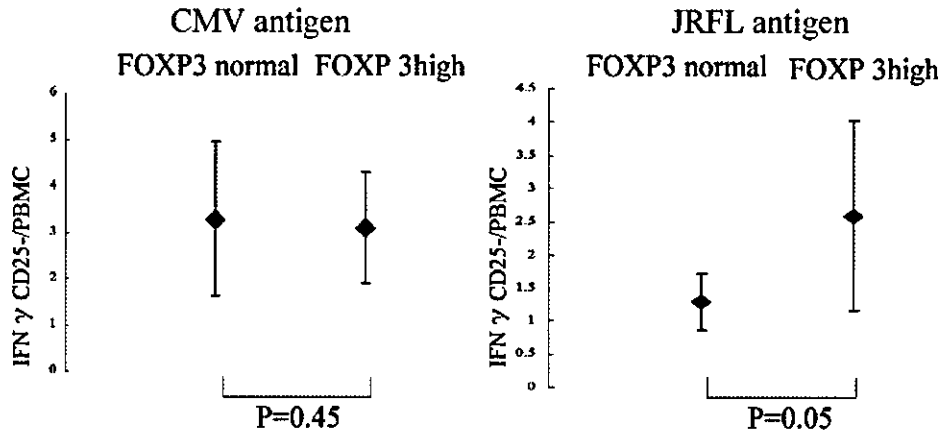


図7. FOXP3 high 群では HIV 抗原に反応して IFN γ を産生するヘルパー T 細胞を制御している制御性 T 細胞活性が高い FOXP3 high 群と FOXP3 normal 群を比較すると、どちらの群でも CD25-PBMC を刺激した場合のほうが IFN γ 産生の有意な増加がみられるが、その増加率で比べると、HIV 抗原で刺激した場合に有意な増加が見られた。

D. 考察

我々は HAART 開始後に自己由来の分離株に対する中和抗体が再構築されうることを報告してきた。一方、細胞性免疫については、慢性感染例では HIV 特異的ヘルパー T 細胞の反応が欠如しており、HAART が開始されると CTL 活性も減弱すると報告され、長期間 HAART が有効な症例に関して HIV に対する細胞性免疫の再構築に関する報告はほとんどなかった。今回の我々は、HAART 療法のみにて、細胞性および液性の免疫再構築が起こることを初めて示した。中和抗体反応群(上昇群)と、CD8 で何らかの HIV 特異的なサイトカイン産生が見られる群、およびいずれも見られない群(液性免疫反応群、細胞性免疫反応群、無反応群ということになる)に分け、それぞれの CD4 細胞のサイトカイン産生を見ると、主に CD4naive 分画で興味深い違いが見られた。すなわち、液性免疫反応群は、IFN(-)、IL4(+)、細胞性免疫反応群は、IFN(+)、IL4(-)、無反応群は IFN(-)、IL4(-)、であった。一方、IL2 単独産生に関しては、3 群間で大きな違いは見られなかった。これらのデータから、中和抗体再構築症例では、TH2 タイプの免疫再構築が起こっているが、TH1 タイプの免疫反応は不十分であり、一方、CD8 に反応の見られた中和抗体 (-) 例では、TH1 タイプの免疫再構築が起こっているが、TH2 タイプの免疫反応は不十分と考えられた。このような違いが起こるメカニズムは不明であり、今後の研究のテーマのひとつである。我々はまた制御性 T 細胞の研究から、約半数の HIV 感染症例で、非感染例よりも FOXP3 が過剰に発現していることを見出した。しかも、この結

果は、多くの HIV 感染症例で、抗 HIV 免疫の再構築が T_R による抑制を受けている可能性を示唆すると考えられる。すなわち、抗 HIV 免疫応答の再構築には、抗ウイルス療法の継続によるウイルス増殖の抑制だけでなく、T_R による抑制を回避して、抗 HIV-1 免疫を強化する、新たな免疫賦活療法の開発が必要と考えられる。

E. 結論

我々は、HAART 療法のみにて、HIV に対する細胞性および液性の免疫再構築が起こることを初めて示した。しかし、これらの抗 HIV 免疫は長期非進行症例に見られるものと異なり、不完全な再構築と考えられる。また、HIV 特異的ヘルパー T 細胞の再構築～活性化は制御性 T 細胞の過剰反応によって抑制されている可能性がある。これらから、長期非進行症例に見られるような有効な細胞性液性の免疫応答を得るには、抗ウイルス療法の継続によるウイルス増殖の抑制だけでなく、T_R による抑制を回避して、抗 HIV-1 免疫を強化する、新たな免疫賦活療法の開発が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

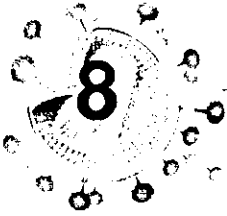
1. Matsushita, S., Yoshimura, K., Kimura T., Kamihira, A., Takano, M., Eto, K., Shirasaka, T., Mitsuya, H., Oka, S.: Spontaneous recovery of hemoglobin and neutrophil levels in Japanese patients on a long-term Combivir[®] containing regimen. J.Clin.Virol. 2004 (in press).
2. Sakaguchi, N., Kimura T., Matsushita, S., Fujimura S., Shibata J., Araki M., Sakamoto T., Minoda S., and Kuwahara K. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in *ganp* gene-transgenic mouse. J. Immunol. 2005 (in press).

国際学会発表

1. Koito, A: Restriction factors against HIV-1 replication in small animal cells. 5th AIDS seminar in Kumamoto, 2004.9.9-10.Kumamoto
2. Yoshimura, K: Evaluation of residual viral replication for optimization of highly active antiretroviral therapy (HAART). 5th AIDS seminar in Kumamoto, 2004. 9. 9-10. Kumamoto.
3. Shibata, J., Wang, F. X., Kimura, T., Iwata R., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Involvement of C3 mutation in neutralization sensitivity for anti-V3 antibodies. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9. 9-10.Kumamoto.
4. Iwata, R., Shibata, J., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Cross neutralizing activity of serum antibodies with neutralizing activity against autologous HIV. 5th AIDS seminar in Kumamoto 2004. 9. 9-10.Kumamoto.
5. Kenai, A., Kimura, T., Yoshimura K., Koito, A., Matsushita, S.: Efficient induction of both cellular and humoral immune response by immunization with Tat-Nef fusion protein (tNEF) without adjuvants. XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
6. Matsushita, S., Kimura, T., Shirai, N., Koito, A., Yoshimura, K. New approach for optimization of HAART; Evaluation of residual viral replication by monitoring proviral DNA level and T cell turnover rate. [TuPeA4356], XV International AIDS Conference Bangkok, 2004. 7. 11-16, Bangkok, Thailand.
7. Matsushita, S.: International symposium of AIDS Research Institute in Yonsei University College of Medicine "HIV/AIDS" . 2004. 10. 15. Seoul, Korea.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし



Structured Treatment Interruptions(STI) による免疫療法

分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

研究協力者：木村 哲¹、菊池 嘉¹、立川 夏夫¹、照屋 勝治¹、
 潟永 博之¹、田沼 順子¹、山中ひかる²

(¹国立国際医療センターエイズ治療・開発センター、

²(財)エイズ予防財団)

研究要旨

Structured Treatment Interruptions (以下 STI) は、HAART を計画的に中止・再開し小規模なウイルス血症をおこして HIV 特異的免疫の活性化を目的とした治療である。当院を受診した急性 HIV 感染者に対して同治療を実施し、臨床経過・効果等を評価した。原則 d4T/3TC/IDV/RTV を使用し、3 週間の休薬を、計 5 回挿入した。休薬は、HIV-RNA が 50copies/ml 未満に達してから行った。また、最初の休薬は、3 ヶ月以上かつ HIV-RNA 50copies/ml 未満に達し 1 ヶ月治療を行った後に行った。2000 年 11 月～2002 年 12 月の間に、26 名 (M:F=24 : 2) が参加した。多くが、何らかの症状を呈して受診し、HIV 初感染と判明した者であった。15 例 (58%) が 5 回休薬を含むプロトコールを完遂したが、7 例 (27%) は休薬回数が 5 回に満たない時点で、本人の希望や副作用により治療を中断した。4 例は CD4 数が低く治療継続が必要なため、本治験より脱落となった。

プロトコールを完遂した 15 例について、HIV-RNA の推移をみると、休薬中のリバウンド viral load は、休薬回数を重ねる毎に低下が認められたが、治療を完全に中止した後は、徐々に viral load が上昇し、持続的な viral load 抑制効果は認められなかった。慢性期の症例の set point (平均 4.418log₁₀copies/ml) と比較しても、有意な差はみられなかった。また、15 例中 1 例は、治療終了後約 1 年で CD4 数が 200 以下に低下し HAART 再開が必要となった。治療後 6 ヶ月毎に平均 viral load をみると、1 年までは 4log₁₀copies/ml 未満の症例が 60% 以上を占めていることから、初期には比較的 viral load が低く抑えられている傾向がみられた。

A. 研究目的

HIV 感染症は宿主の CD4 細胞数を減少させ、進行性の免疫不全を引き起こす。多剤併用による強力な抗ウイルス療法：HAART (highly active anti-retroviral therapy) は、HIV の増殖を抑制し、免疫不全の

進行をくい止め、予後を劇的に改善させることが明らかとなった。

しかし、治療開始のタイミングについては、いくつかの変遷を経ている。すなわち、以前、抗 HIV 療法は、「Hit Early and Hard」といわれ、早くから強

力な治療を導入するのがよいとされてきた。しかし、HIVを体内から根絶するのは、事実上不可能であることが分かってきた。また、長期的な副作用が問題となってきたため、最近の治療開始は、より遅らせる傾向にある。CD4数が $200/\mu\text{l}$ 以下になると、様々な日和見感染症のリスクが高まることから、CD4数が $200/\mu\text{l}$ に達する前に導入するのが望ましく、治療ガイドラインでは、CD4数 $200\sim 350/\mu\text{l}$ の時期に治療を開始するよう設定されている。

一方、HIV感染早期においては、HIV特異的免疫が比較的保たれ、その後急速に失われていくということが分かっている。そのため、これら急性HIV感染者の早期治療導入の有用性が示唆されている。しかし、自然経過ではAIDS発症まで10年位かかる本疾患において、早期に治療を導入することは、極めて長期間の内服治療を意味し、患者のQOLを大きく損なう可能性があることや、治療の長期毒性が、早期治療導入の問題点となっていた。

Structured treatment interruptions (STI)は、HAARTを計画的に中止、再開することで、意図的に小規模なウイルス血症を起こし宿主の免疫系を刺激・活性化することで、ウイルスの抑制能を高めようという、新しいHIV治療戦略の一つである。特に急性期に治療を導入された患者は、HIV特異的免疫が比較的保持されているため、同法による免疫賦活が有効である可能性が高いといわれ、これまでも海外の報告がいくつかある。

HIV感染症が、急性期に診断されることは多くないが、感染時50-90%になんらかの急性レトロウイルス症候群の徴候が認められ、症状出現時に患者が医療機関を受診し適切な検査が行われた場合、急性HIV感染症の診断が可能である。その場合、感染早期にSTIを含めた抗HIV療法を行う機会が得られると考えられる。

当院は、国内のHIV診療において、新しい有望な治療を評価し、希望者には治療の機会を提供する役割を担っている。このような新しい治療方法を提供すべく、この度、希望者に対し、急性HIV感染症において、早期治療導入とSTIによる免疫療法を実施することとなった。

B. 研究方法

実施にあたっては、以下の点を満たすことを条件とした。

(ア) 本研究の実施に関しては、実施施設である国立国際医療センターの倫理委員会の承認を得る

(イ) 本研究の実施にあたっては、被験者に対し研究目的、研究の背景、研究の方法、人権の保護に関する事項などを文書で説明し、被験者の署名による同意を得る。

また、本研究の実施にあたり、担当医師は被検者に対して下記事項に関して、文書および口頭で十分に説明し、被検者は、十分に時間をかけて実施事項に関して理解した後、自由意思により同意書に署名し担当医師に提出するものとした。担当医師は、被験者が未成年者の場合は保護者もしくは法定保証人にも説明し、保護者もしくは法定保証人からも署名された同意書を得ることとした。

同意書（被験者への説明文）には、①研究の目的、②研究の背景、③研究の方法、④予想される結果、⑤予想される副作用とそれに対する処置、⑥同意しない場合にも、その後の診療にあたりいかなる不利益も受けないこと、⑦同意した後も、被験者もしくは保護者の自由意思でいつでも同意を撤回できること、⑧被験者の人権保護に関する事項、以上8点について十分な情報を記載した。

●被験対象者

以下の選択基準のすべてを満たし、且つ除外基準のいずれにも該当しない者を、当研究の被検対象とした。

(ア) 選択基準

- ・感染後6ヶ月以内の急性HIV感染症と診断され、本研究への参加を希望する者

(イ) 除外基準

- ・年齢15歳未満の者
- ・活動性の日和見感染症を発症した者
- ・精神科疾患を合併する者
- ・ステロイド剤や免疫抑制剤等を使用している者

●研究実施方法

(ア) 急性HIV感染の診断

原則として、6ヶ月以内に、以下の急性感染を示唆する症状(*)を呈するか、感染のリスクが高い行為があった者を対象に、以下の診断基準に従い、急性HIV感染を確認した。

- 1) HIV抗体陰性かつHIV-RNA陽性
- 2) WBによる確認試験で経時的に陽性バンドの増加を確認

3) 経時的に抗体価の上昇を確認

1) -3) のいずれか、あるいは両者を満たす場合。

(*) 急性感染を示唆する症状

発熱、リンパ節腫脹、咽頭炎、発疹、筋肉痛、
関節痛、肝脾腫

(イ) 治療内容

【治療導入】

治療は HIV 治療ガイドライン (米国保健福祉省) に従い、3 剤以上を用いた併用療法を行った。原則として、d4T/3TC/IDV/RTV を用いるが、耐用性などを考慮し、他のレジメンへの変更も可能とした。

【STI (休薬)】

3 週間の休薬 (STI) を計 5 回挿入。休薬期間は 3 週間に固定した。休薬のタイミングは、HIV-RNA 量が検出限界以下 (50copies/ml) となっているのを確認した時点で行った。ただし、初回の休薬は、抗 HIV 療法開始後 3 ヶ月以上経過し、HIV-RNA 50copies/ml 未満に達し 1 ヶ月経過した後、また、CD4 数が $500/\mu\text{l}$ 以上で安定していることを確認して行った。(図 1)

(ウ) 副作用出現時の対応

HAART 開始に伴う副作用が見られた場合には、薬物による対症療法にて対処したが、副作用が重篤な場合、治療薬剤の変更や中断を十分検討した。

(エ) 研究の継続中止の決定

本研究の継続が被験者にとって明白な不利益を与えられとされる場合は、担当医は本研究を中止し、その旨を被験者に口頭または文書で詳細に説明するとともに、研究代表者に連絡するよう徹底した。

また、被験者が本研究継続中に本研究への参加を撤回する意思表示をした際は、担当医は速やかに本研究を中止した。

(オ) 評価項目

STI を含む治療終了後、以下の項目を測定し、その臨床的意義を評価する。

【臨床上の治療効果に関する評価項目】

- CD4 数、HIV-RNA 数等の検査値の推移
- 薬剤耐性変異出現の有無

【HIV 特異免疫の誘導に関する評価】

(熊本大学滝口教授)

- 細胞内サイトカイン発現量を用いた HIV-1 特異的 CD4 細胞
- MHC テトラマーを用いた HIV-1 特異的 CD8 細胞 (HIV-1 特異的 CTL)

●研究期間

2000 年 11 月 1 日～2002 年 12 月 31 日

C. 研究結果

●対象者背景

2000 年 11 月 1 日～2002 年 12 月 31 日に当院を受診した初診患者は 432 名、うち 32 名が感染 6 ヶ月以内の急性 HIV 感染と診断された。この 32 例中 26 例が本研究に参加した。

(ア) 平均年齢：36 (21-56) 歳

(イ) 男女比：24 対 2

(ウ) 治療導入前：

平均 CD4 数：479 (49-4459) $/\mu\text{l}$ 、

平均 HIV-RNA : 5.33 (3.26-6.91) log c/ml

(エ) 初回休薬までの治療期間：

平均178 (35-577) 日間

* 選択された治療薬：

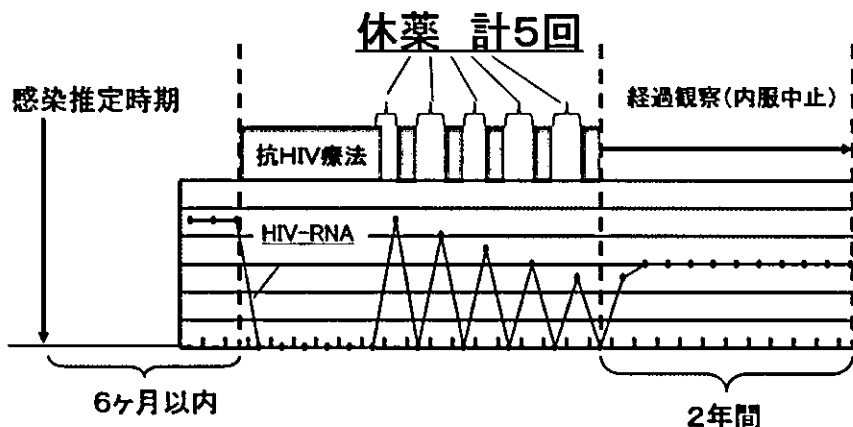


図 1. 治療概要

- d4T/3TC/IDV/RTV22 (例)
- d4T/3TC/NFV2
- AZT/3TC/EFV2
- (オ) 急性レトロウイルス感染症状
 - 有23 (例)
 - 無3
- * 症状の内容：
 - 発熱23 (例)
 - リンパ節腫脹9
 - 発疹8
 - 下痢7
 - 咽頭痛7
 - 頭痛5
 - 口腔カンジダ症3
 - 意識障害2
- (カ) 初感染の診断
 - WB バンド増17 (例)
 - 抗体価上昇7
 - 抗体陰性かつ RNA 陽性2

●治療経過

(ア) プロトコール実施状況 (完遂・中断・脱落)
(図 2)

15 例 (58 %) が 5 回休薬を含むプロトコールを完遂した。その全治療経過を終了した 15 例における総治療期間は平均 462 日間 (322 日～627 日) であった。

7 例 (27%) は休薬回数が 5 回に満たない時点で、本人の希望や副作用により治療を中断した。治療を中断した 7 例のうち 5 例は、嘔気などの軽度な副作用

用や、服薬遵守の精神的苦痛から、本人が内服継続困難と訴えて、プロトコールを完遂できなかった。初感染患者で CD4 数が比較的高いこと、IDV の副作用対策として大量の飲水を必要としたことなどが、継続内服の動機を低下させたものと考えられる。

残りの 4 例は、CD4 数が低く治療継続が必要なため、休薬することができず、本治療より脱落となった。

(イ) 有害事象

- 下痢6 (23 %) (例)
- 尿路結石5 (19 %)
- 皮膚乾燥3 (12 %)
- 嘔気2 (8 %)
- 陥入爪1 (4 %)
- やせ1 (4 %)

このうち、治療中断の理由となった副作用は、尿路結石の 1 例のみであった。

●中間評価

最終的に、26 症例すべてが治療を終了し 2 年間経過した時点で、臨床的な効果を判定する予定であるが、このたび、現時点 (2005 年 1 月現在) における成績を、中間評価としてまとめた。過去 3 回、中間評価を実施したが、今回は、より長い経過を観察した結果をまとめることができた。

①休薬と HAART の効果

HAART の効果に関しては、休薬回数を重ねても、一貫してウイルス学的に良好な反応が得られ、最終

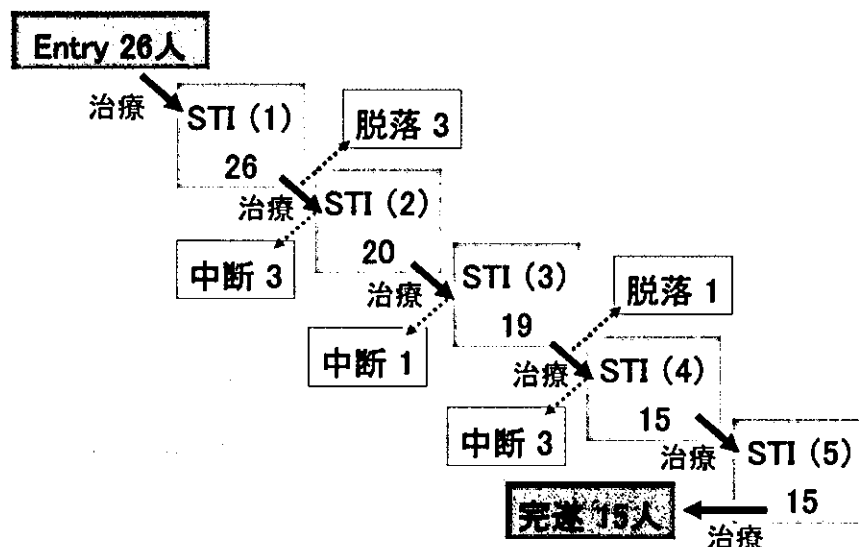


図 2. 治療経過

的に治療を終了する直前の HIV-RNA は、すべての症例で 50copies/ml 未満（検出限界以下）であった。

②脱落例 4 例の背景

急性感染期に治療を導入しているにもかかわらず、CD4 が低くて HAART 休薬ができなくなった脱落例が、26 例中 4 例、15.4 % に及んだ。そのうち、3 例は STI 回数 1 回、1 例は STI 回数 3 回と、最低でも 1 回の STI が実施されていた。脱落例は、早くから CD4 数が低い傾向にあったが、治療前の HIV-RNA や急性レトロウイルス感染症状の有無・重症度などには、完遂例と差が認められなかった。

③5 回の STI を含むプロトコール完遂例 15 例の経過

プロトコールを完遂した 15 例の、HIV-RNA 量の推移をみてみると、休薬中のリバウンド HIV-RNA

の平均値は、休薬回数を重ねる毎に低下が認められた（図 3）。

治療を完全に中止した後の HIV-RNA 量は、3ヶ月毎の平均値でみると（図 3）、4log copies/ml 以下の比較的低い値で推移しているが、これまでの海外の報告にあるような著しい HIV-RNA 量抑制効果は認められなかった。また、CD4 数も徐々に低下していった（図 4）。しかし、1 年以内は 4log copies/ml 以下にとどまっている症例の割合が 60 % で、以後、徐々にその割合が低下していることが分かった（図 5）。

一方、2000 年から 2004 年に当院を受診した慢性感染例の set point は、平均 4.418log/ml である。STI のプロトコール完遂群における、治療終了後 6ヶ月毎の平均 HIV-RNA 量と、その慢性感染例の set

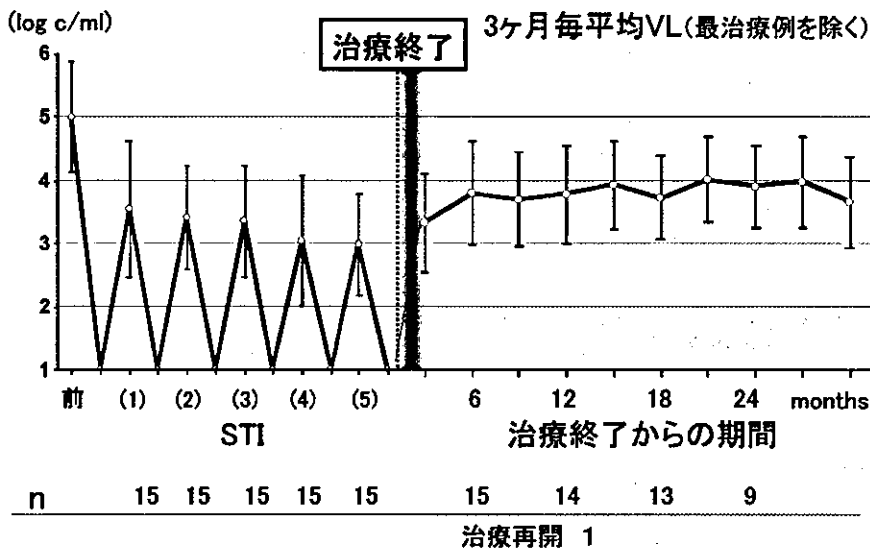


図 3. 血中 HIV-RNA 量(完遂例 n=15)

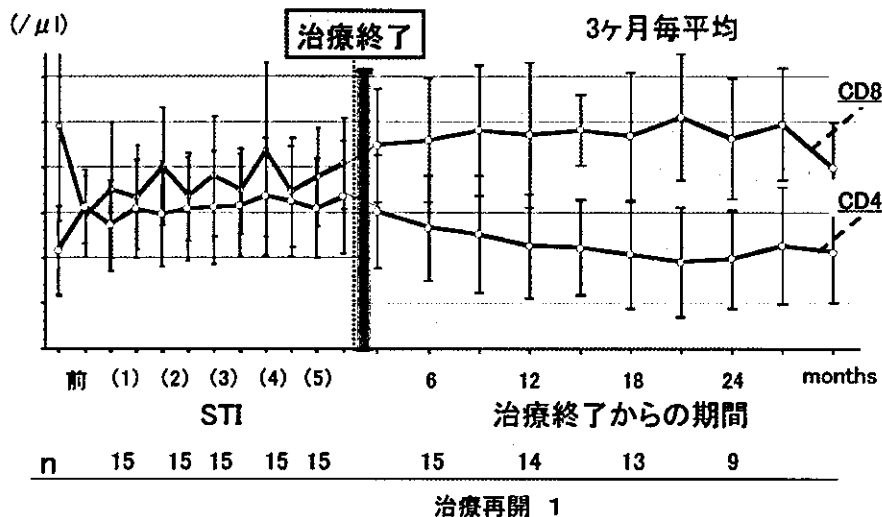


図 4. CD4・CD8 陽性細胞数(完遂例 n=15)