

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



ケモカインレセプターによる免疫応答に関する解析

分担研究者：森内 浩幸（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 新興感染疾病病態制御学系 教授）

研究協力者：森内 昌子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助手）

研究要旨

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されるが、この治療法の有効性と安全性の確保のために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報が求められる。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）を及ぼすのであれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものであり、“CCR5 の発現とその制御機序”に関する研究では、（1）性行為感染や母子感染に関与する可能性のある宿主因子（精液や母乳由来の因子や alpha-fetoprotein [AFP]）、（2）日常生活の中で変動する宿主因子（日内変動の影響を受ける転写因子 DBP やストレス反応・運動に関与する catecholamine [CA]）、そして（3）日常的によく経験され特に親密な人間関係の中で伝播しやすい感染症（EB ウイルス）が CCR5 の発現に及ぼす影響について報告した。“CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響”に関する研究では、（1）特異的な CCR5 agonist である RANTES、そして（2）非特異的な CCR5 antagonist として疑われる AFP が HIV-1 感染に及ぼす影響を、*in vitro* の感染実験や患者から採取した PBMC に潜伏した HIV-1 の *ex vivo* における再活性化実験において示した。

A. 研究目的

従来の治療法の限界（薬剤耐性ウイルスの出現や許容し難い副反応）を打開するための新たな治療戦略として、ケモカイン・レセプター、特に CCR5 をターゲットとした治療薬が注目されている。しかしこの新たな治療法が有効かつ安全に行えるために明らかにしておくべき事がある。第一に、CCR5 の発現には個人差があり、また様々な刺激により変動するため、治療効果を最大限に発揮させるためには、CCR5 の発現とその制御についての情報を得る事が望ましい。第二に、開発される薬剤が CCR5 に結合

するケモカインの作用を阻害するか、逆にケモカイン類似の作用（細胞の遊走・活性化）をもたらすのであれば、免疫のバランスを崩し逆に HIV 感染者にとって不利な状況をもたらす恐れもある。本研究はこれらの課題を追求するものである。

B. 研究方法

1) 細胞

健康成人から末梢血単核球(PBMC)を、そして健

常規臍帯から臍帯血単核球 (CBMC) を分離した。実験によってはさらに Auto-MACS (Miltenyi Biotec) を用いて T 細胞 (CD3-positive) と単球 (CD14-positive) の 2 分画を採取した。後者は 7 日間の培養の後に monocyte-derived macrophages (MDM) として実験に供与した。また monocyte-derived dendritic cells (MDDC) への分化は GM-CSF と IL-4 を添加して 7 日間培養することによって誘導した。PBMC からの CD8 陽性細胞の除去は Dynabeads M-450 CD8 (DYNAL) を用いて行った。

2) 急性 EB ウイルス感染患者の検体

急性 EB ウイルス感染症の患者 6 名にインフォームド・コンセントを得た上で急性期と回復期の 2 回採血し、全血のまま CD4 と CCR5 の二重染色 (下記) を行うとともに、末梢血単核球 (PBMC) を分離し冷凍保存した。後日同時に興した PBMC を無刺激のまま HIV-1 *in vitro* 感染実験 (下記) に供した。

3) HIV-1 感染患者の検体

HARTT によりウイルスが検出限界以下となった患者からインフォームド・コンセントを得た上で採血し、CD8-depleted PBMC 培養において種々の因子を添加し、1 週間毎に健康成人由来の CD8-depleted PBMC を補充しながら 6 週間まで培養を続け、この間 1 週間毎に培養上清を採取した。

4) 試薬等

精漿 (seminal fluid, SF) は健康成人男子から採取した精液を遠心し、その上清を用いた。実験によっては SF に加熱処理、proteinase K (PK) 処理 (proteinase K-acryl beads (Sigma)、または抗 prostaglandin E2 (PG-E2) (R&D Systems) 抗体処理を行った。

乳清 (milk whey, MW) は健康授乳婦の母乳を遠心し、その上清を用いた。牛乳由来の sialyl lactose (SL) および lactoperoxidase (LPO) は川上浩博士 (雪印乳業株式会社技術研究所) より供与された。

AFP は臍帯血から抽出したもので Calbiochem から購入した。PG-E2、Norepinephrine (NE)、lipopolysaccharide (LPS)、および phytohemagglutinin (PHA) は Sigma から購入した。RANTES および IL-7 は PeproTech から購入した。抗 DC-SIGN 抗体は R&D Systems から購入した。

5) CCR5 の発現

モノクローナル抗 CCR5 抗体 (2D7) で細胞表面

および細胞内を染色し flow cytometry (FACScan) によって CCR5 の発現を調べた。細胞内染色には Cytofix/Cytoperm (PharMingen) を用いた。

CCR5 mRNA level の定量は、細胞から total RNA を QIAamp RNA Kit により抽出し iCycler iQ™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) を用いた real time RT-PCR (primers: 5'-CAAAAAGAAGGTCTTCAT-TACACC-3' および 5'-CCTGTGCCTCTTCTTCT-CATTTTCG-3')。同時に定量した tubulin mRNA copy 数を元に細胞あたりの CCR5 mRNA copy 数を算定した。

6) CCR5 プロモーター解析

CCR5 promoter/luciferase reporter vector とその derivatives を用いた transient expression assay は、PBMC に electroporation で vector を導入した後、2 日後に cell lysate の luciferase 活性を測定することで評価した。DBP expression vector (Dr. S. Hunger, Univ. of Colorado より供与) による強制発現の効果は、PBMC を用いた上記の luciferase assay と、293 細胞を用いて細胞核抽出液を調整して施行した gel shift assay によって調べた。

7) HIV-1 感染実験

HIV-1 の増殖は培養上清中の p24 抗原レベルを ELISA で測定するか、逆転写酵素活性を RT assay で測定し評価した。また NL4-3Luc-R-E- clone に種々の Env 糖蛋白を補填したウイルスストックを用い、single-round viral replication assay も施行した。

ウイルスの quasispecies に関しては、HIV-1 Env gene の C2V3 領域を PCR で増幅後に塩基配列を決定し系統樹解析を行った。

8) HIV-1 entry assay

HIV-1 感染後 24 時間で細胞 DNA を抽出し、proviral load を real time PCR により定量した。

9) HIV-1 LTR プロモーター解析

pGL-HIV-1-LTR (HIV-1 LTR-driven luciferase reporter) とその derivatives を用いた transient expression assay は、PBMC へ electroporation により、そして MDM に対しては calcium phosphate 法を用いて行った。

10) MDDC から T 細胞への HIV-1 transmission

実験

MDDC を zidovudine (ZDV) によって前処理し、ウイルスの吸着や侵入は起こってもそれ以降の逆転写の過程には進まないようにした上で MDDC を AD8 (R5-HIV-1) でパルスし、1 時間後に細胞を徹底的に洗浄し、その後に T 細胞と共培養し、2 日後に細胞から DNA を抽出して proviral load を real time PCR で定量した。

C. 研究結果

1) CCR5 の発現とその制御機序

① 性行為感染や母子感染に関与する可能性のある宿主因子が CCR5 の発現や HIV-1 感染へ及ぼす影響：

Seminal Fluid Downregulates CCR5 Expression on Macrophages

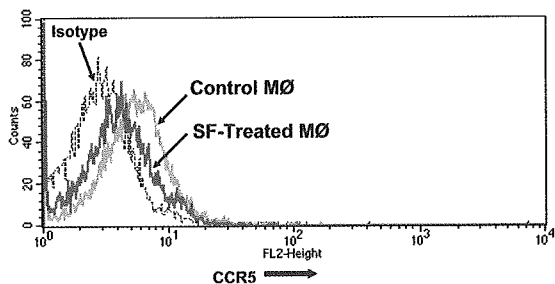


図 1

Seminal fluid-mediated downregulation of CCR5 expression on MDM

	Donor #1	Donor #2	Donor #3
Control	5.2%	12.1%	8.3%
SF: untreated	1.0%	3.2%	3.7%
heated	1.1%	3.8%	3.2%
PK-treated	1.2%	2.5%	3.3%
anti-PG-E2	3.8%	8.8%	7.2%
PG-E2	0.9%	4.2%	2.5%

表 1

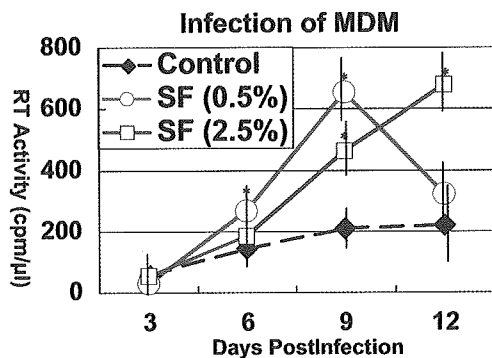


図 2

a) 精液：私達は SF 存在下で MDM の CCR5 発現が減少することを示した (図 1)。この作用は SF の加熱処理や PK 処理には殆ど影響されなかったが、抗 PG-E2 抗体処理によって中和された。また SF の代わりに PG-E2 のみを加えても CCR5 の発現を減少させることができた (表 1)。以上より、SF による CCR5 発現減少をおこす主たる因子は PG-E2 であることが判明した。

SF が CCR5 の発現を抑制することから HIV-1 感染も抑制することが予想されたが、感染実験の結果はその逆であった (図 2)。そこで single-round viral replication assay においてさらに詳細な検討を加えたところ、SF は R5-HIV-1 に対しては前処理では抑制的に、後処理では促進的に作用した。前処理での抗 HIV-1 効果は、Env 糖蛋白を amphotropic な murine leukemia virus のものに置き換えると認められなかった (図 3)。後処理で促進的に作用する機序として、NF- κ B pathway を介した HIV-1 LTR 活性の亢進が示唆された (図 4)。一方末梢血リンパ球 (PBL) においては SF は HIV-1 LTR 活性を低下させ、やはりこの作用にも NF- κ B pathway が関与していると思われた (図 5)。

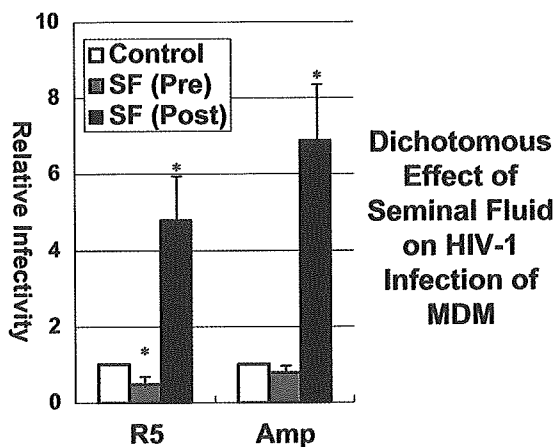


図 3

Seminal Fluid Transactivates HIV-1 LTR in MDM

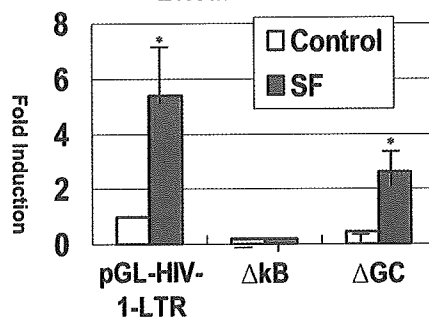


図 4

性行為感染に及ぼす効果をさらに調べるために、MDDC から T 細胞へウイルスが伝播される過程でどのように作用するのかを確かめたところ、SF 処理によって MDDC の CCR5 発現は減少したものの、T 細胞へのウイルスの伝播はむしろ促進することがわかった (図 6)。この作用は抗 DC-SIGN 抗体の添加によって著明に中和されたが CCR5 阻害剤である AOP-RANTES には影響を受けないことから (図 7)、CCR5 をターゲットとする治療はこのステップには著効しないであろうことが示唆される。

b) 母乳：新生児・乳児の PBMC では CCR5 の発現が弱い (図 8)。しかし MW の存在下で新生児・乳児由来の MDM を培養すると CCR5 の発現が亢進することが分かった (図 9)。この効果は T 細胞では明らかでなかった。MW のこの効果はミルク成分の一つである SL でも認められ (図 9)、少なくとも MW の作用の一部を担っているものと思われる。現在これらの因子の刺激を受けた MDM の HIV-1 への感染性について調べているところである。

Seminal Fluid Transrepresses HIV-1 LTR in PBL

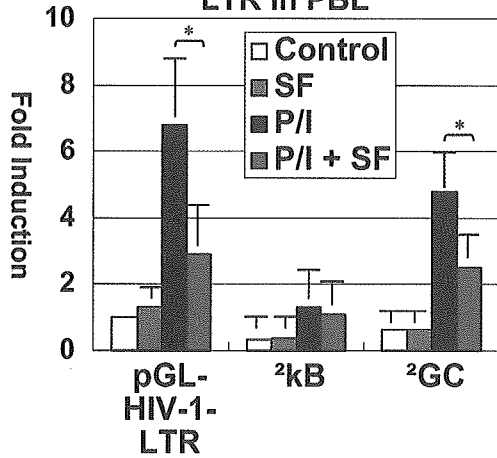


図 5

Seminal Fluid Decreases CCR5 Expression on MDDC but Increases MDDC-T Cell Transmission of HIV-1

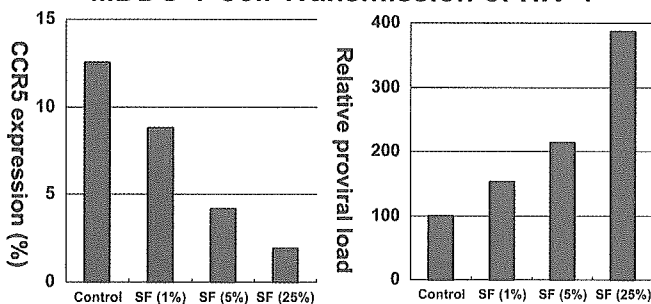


図 6

Preliminary な結果として、MW や SL や LPO は短期間の前処理ではむしろ HIV-1 感染を抑制することが示されている (data not shown)。

Anti-DC-SIGN, but not AOP-RANTES, Inhibits Seminal Fluid-Induced MDDC-T Cell Transmission of HIV-1

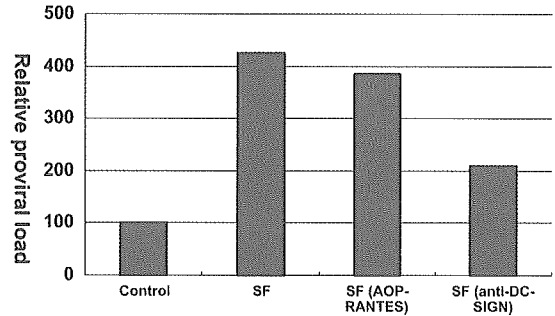


図 7

Lower CCR5 Expression on Cord Blood Mononuclear Cells

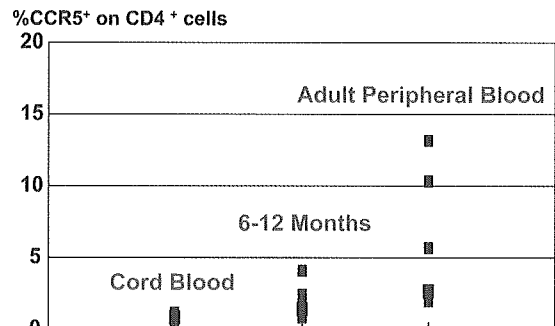


図 8

Induction of CCR5 Expression on MDM by Milk Whey or Sialyl Lactose

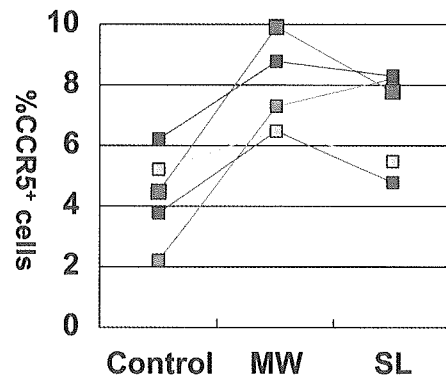


図 9

c) AFP：また既に私達は AFP 存在下で培養した MDM と T 細胞の CCR5 発現が低下していることを示していたが、この作用は MDM では overnight 処理でも認められたが、T 細胞においては短期間（2～3 日以内）では明らかでなく、比較的長期間（2～3 週間）の培養によって顕著となった（図 10）。AFP の添加は CD69 や HLA-DR のような活性化マーカーの発現度には殆ど影響を及ぼさなかった（data not shown）。

比較的短期間の前処理を行うと、AFP は MDM への HIV-1 侵入を阻止したが、PBL への侵入は阻止しなかった（図 11）。しかし CCR5 発現レベルへの影響にかかわらず、そして Env 糖蛋白の種類にかかわらず、AFP は PBL における HIV-1 感染を抑制した（図 12）。そこでその機序を探ったところ、AFP は HIV-1 LTR 活性を抑制することがわかり（図 13）、

少なくとも一部にはこの作用が関与していると思われる。

②日常生活の中で変動する宿主因子が CCR5 発現や HIV-1 感染へ及ぼす影響：

a) 日内変動の影響を受ける転写因子 DBP：DBP は CCR5 プロモーターに結合し（図 14）その活性を亢進させるが、DBP 結合部位を変異させるとその効果はなくなった（図 15）。DBP の発現は日内変動の影響

Downregulation of CCR5 Expression on T Cells by AFP

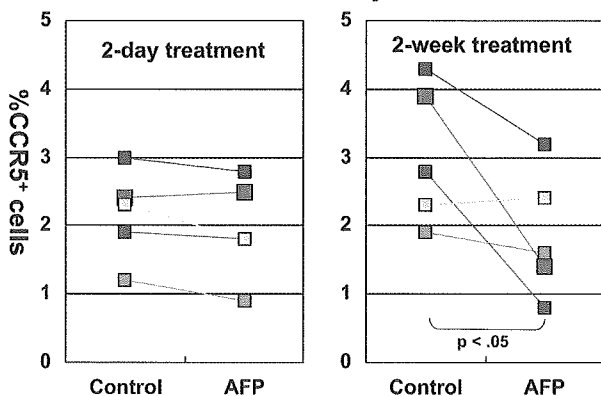
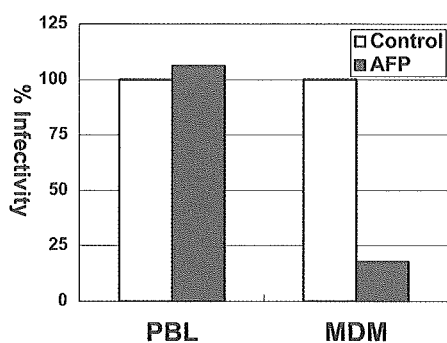


図 10

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.

図 11

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

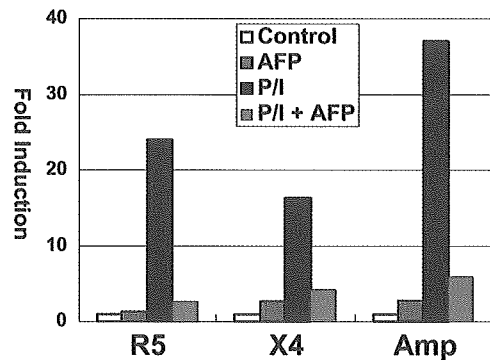
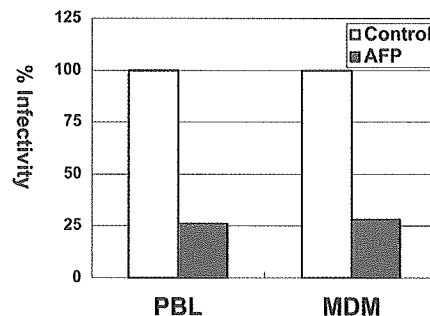


図 12

AFP Downregulates HIV-1 LTR Activity



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

図 13

DBP Binds to CCR5 Promoter

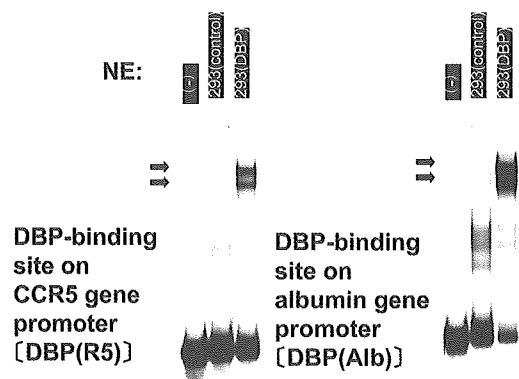


図 14

響を受けて朝に弱く夜に強くなる (図 16)。同様に、PBMC における CCR5 mRNA レベルは僅かではあるが夜に高い傾向にあり (図 17)、この日内変動に DBP の作用が関与している可能性がある。

b) ストレス反応・運動に関与する catecholamine [CA]: CA の代表的なものである NE は、ホルモンとして血中に 10 nM レベルまで検出され、神経伝達物質としてリンパ節を支配する神経の末端から μM レベルでも放出される。血中の生理学的レベルでも NE は HIV-1 の増殖を抑制することを明らかにした (図 18)。この機序として CCR5 の発現に及ぼす影響を調べてみたが、そこへは殆ど作用せず (data not shown)、抗 HIV 効果は主に NF- κ B の活動性の抑制を通じて HIV-1 LTR の活性を下げることにあると思われる (図 19、20)。

③日常的によく経験され特に親密な人間関係の中で伝播しやすい感染症が CCR5 発現や HIV-1 感染へ及ぼす影響:

a) EB ウイルス感染: 急性 EB ウイルス感染症に伴

い CD4⁺T 細胞の CCR5 発現が亢進し (図 21)、R5-HIV-1 感染を促進した (図 22)。一方急性 EB ウイルス感染症は CXCR4 の発現には殆ど影響を及ぼさず、X4-HIV-1 感染への作用も認めなかった (data not shown)。

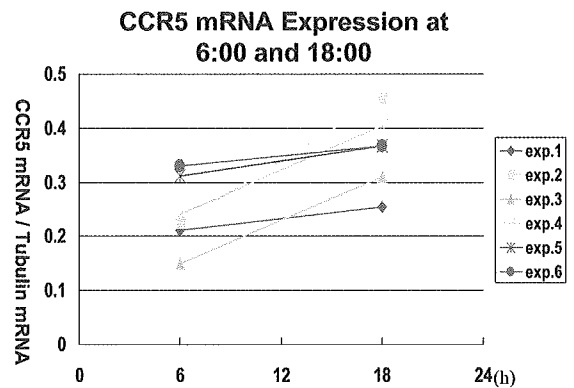


図 17

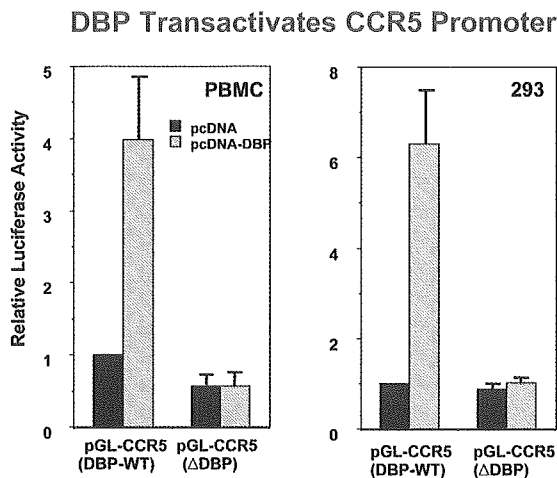


図 15

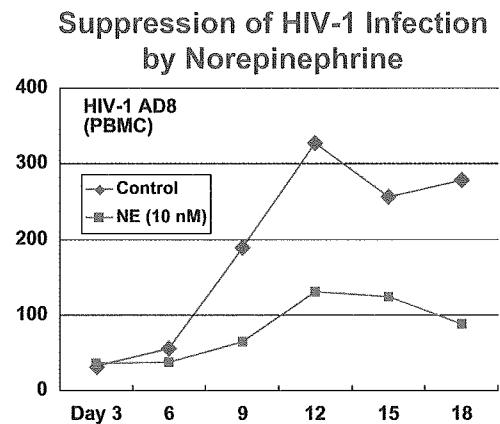


図 18

Circadian Expression of DBP in PBMC

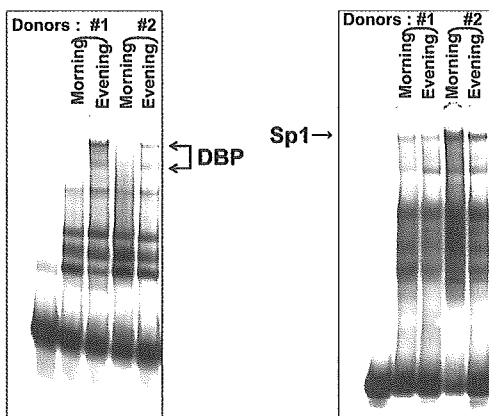


図 16

Norepinephrine (NE) Decreases Binding of NF- κ B, but not of Sp1, to HIV-1 LTR Promoter

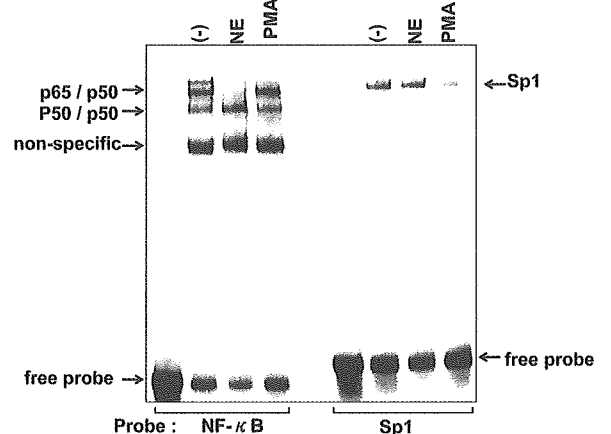


図 19

2) CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響

①特異的な CCR5 agonist である RANTES が HIV-1 感染に与える影響：

HART により潜伏状態にある HIV は CD8-depleted PBMC への様々な *ex vivo* の刺激を加え、かつ allo の CD8-depleted PBMC との共培養によって再増殖を促すことができる。この際に出現するウイルスの C2V3 領域の塩基配列から coreceptor usage によるウイルスの型分け (R5, R5X4, X4) が可能で、また quasispecies の系統樹解析を行うことができる。

RANTES の存在下で出現したウイルスは X4 また

は R5X4 タイプであった (表 2)。また RANTES を含めた様々な刺激でウイルス増殖を促すと、異なった刺激では少し異なる quasispecies を検出した (図 21)。興味深いことに RANTES (CCR5 ligand) の存在下で出現したウイルスは LPS (グラム陰性桿菌細胞壁成分) の刺激で出現するウイルスに類似していた。

②非特異的な CCR5 antagonist として疑われる AFP が HIV-1 感染に及ぼす影響：これに関しては上述した (1)-①-c)。

Increased CCR5 Expression during Acute EBV Infection

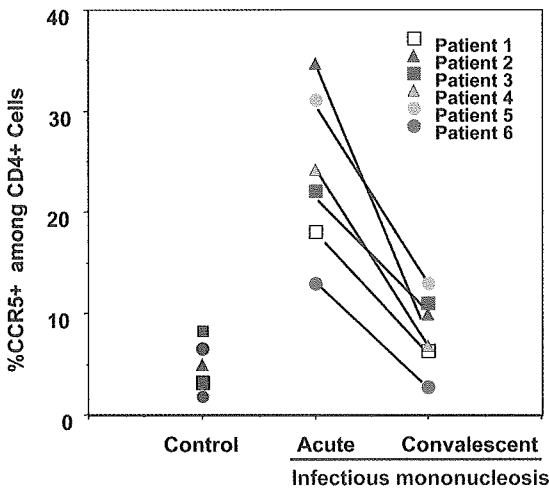


図 20

Ex vivo Induction of HIV-1 Replication in PBMC from individuals with low or undetected plasma viremia

donor	HIV-1 recovery ex vivo in: Control / Anti-CD3 / RANTES / Anti-CD3 + RANTES	Deduced coreceptor usage
#1	- / - / - / +	X4
#2	- / + / - / +	X4
#3	- / + / - / +	R5X4

表 2

Increased Infectability by R5-HIV-1 during Acute EBV Infection

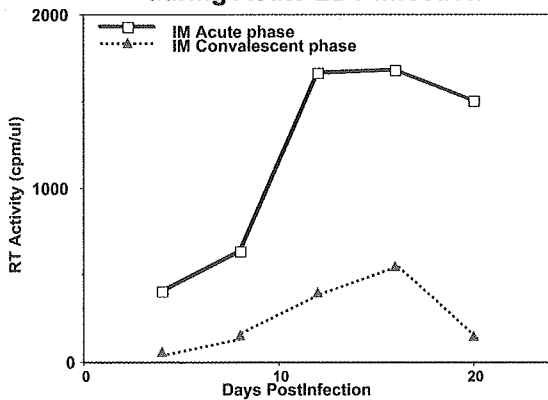


図 21

Phylogenetic analysis of HIV-1 induced ex vivo with stimuli as below:

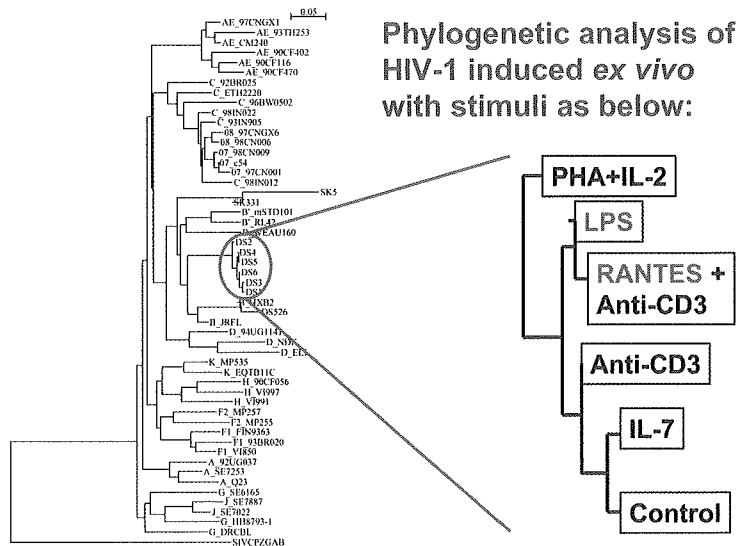


図 22

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、SF や MW 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を示した。CCR5 を標的とする治療法は、患者本人の生命予後や QOL の改善のためだけではなく、その患者から他の人へのウイルスの伝播を防ぐ効果も期待されるが、このような伝播の場所となる compartment における CCR5 の発現のコントロールはそのような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る。例えば私達の実験により、SF は CCR5 を介した HIV-1 感染の効率を下げ一方で、いったん感染が成立すると HIV-1 LTR からの転写を促進し増殖を促した。また MDDC においては、CCR5 発現の減少にもかかわらず MDDC から T 細胞へのウイルス伝播は促進する可能性が示された。

また CCR5 の発現が低い新生児・乳児にあって、MW の刺激は MDM における CCR5 発現を増加させ、この作用は母子感染に関与する可能性がある。さらに胎児・新生児・妊婦の血液中に大量に含まれる AFP は CCR5 発現の抑制を含めた複数の機序によって HIV-1 感染を抑える可能性が示され、もしかしたらこのウイルスが妊娠の第 1・2 三半期には垂直感染しにくい理由の一つになっているのかも知れない。このような状況全てを考察することが、HIV-1 の pathogenesis をさらによく理解することに繋がるものと思われる。

その他にも私達は日常生活の中の様々な事象（例えば概日リズムや適度な運動やストレスなど）や比較的よくみられる感染症で HIV 同様に親密な人間関係が伝播に関与する EB ウイルス感染が、様々なレベル（含、CCR5 の発現のコントロール）で HIV-1 感染に影響しうることを示した。このように CCR5 の発現の影響を及ぼす要因の理解は、この分子をターゲットとする治療を行う際の投与計画にも反映されうることであり、さらなる調査が求められる。

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

とを示したが、その場合特に R5-HIV-1 よりも X4-HIV-1 の出現を促しやすい可能性が示された。以前に私達は LPS のような微生物刺激は CCR5 を利用するウイルス（R5-HIV-1）から CXCR4 を利用するウイルス（X4-HIV-1）への phenotypical transition を促す可能性を示唆してきたが、この結果はそれを裏付けるものであるかも知れない。後者のウイルスがより病原性が強いのかどうかは明らかではないが、後者のウイルスの出現は HIV disease の進行に伴って起こることから注意が必要である。

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., and Moriuchi, H. YY1 transcription factor downregulates the expression of CCR5, a co-receptor for HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* 278:13003-7 (2003).
2. Moriuchi, M., Tamura, A., and Moriuchi, H. In vitro reactivation of HIV-1 upon stimulation with scrub typhus rickettsial infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:557-61 (2003).
3. Moriuchi, M., and Moriuchi, H. Increased infectivity by HIV-1 of peripheral blood lymphocytes in acute infection with Epstein-Barr virus. *J. Med. Virol.* 71:343-346 (2003).
4. Moriuchi, M., Moriuchi, H. Seminal Fluid Enhances Replication of Human T-Cell Leukemia Virus Type I: Implications for Sexual Transmission. *J. Virol.* 78:12709-11 (2004).
5. Moriuchi, 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).

6. Moriuchi M, Yoshimine H, Oishi K, Moriuchi H. Norepinephrine inhibits human immunodeficiency virus type-1 infection through the NF-kappaB inactivation. *Virology*. 345:167-173 (2006).

学会発表

1. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. YY1 transcription factor down-regulates expression of CCR5, a major co-receptor for HIV-1. Keystone symposium "Twenty Years of HIV Research: From Discovery to Understanding". Banff, Alberta, Canada. March 29-April 4, 2003.
2. Moriuchi, M, and Moriuchi, H. Increased infectability by HIV-1 of peripheral blood lymphocytes from acutely Epstein-Barr virus infected individuals. 103rd American Society for Microbiology General Meeting, Washington DC, USA. May 18-22, 2003.
3. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. HTLV-I Tax transactivation of lactoferrin promoter. 11th International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. San Francisco, CA, USA. June 9-12, 2003.
4. Moriuchi, H. and Moriuchi, M. Seminal fluid enhances replication of HTLV-I: implications for male-to-female transmission. 11th International Conference on Human Retrovirology:HTLV and Related Viruses. San Francisco, CA, USA. June 9-12, 2003.
5. Moriuchi, H. and Moriuchi, M. Possible role of GATA-3 in downregulation of CCR5 expression in Th2 lymphocytes. The Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Hyogo, Japan. August 25-28, 2003.
6. Moriuchi, M. and Moriuchi, H. Catecholamines inhibit HIV-1 infection through the NF-(B inactivation. 13th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host. Granada, Spain. June 27-30, 2004.
7. 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.
8. 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.
9. Moriuchi, M., Moriuchi, H. Impact of alpha-fetoprotein 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.
10. Moriuchi M, Moriuchi H. Dichotomous Effects of Seminal Fluid on HIV-1 Infection of Macrophages. Keystone symposium "HIV Pathogenesis/HIV Vaccines". Banff, Alberta, Canada. April 9-15, 2005.
11. Moriuchi M, Moriuchi H. Dichotomous effects of alpha-fetoprotein on HTLV-I infection: Implications for mother-to-child transmission. 12th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Half Moon, Jamaica. June 21-25, 2005.
12. Moriuchi M, Moriuchi H, Kawakami H. Suppression of HIV-1 infection by breast milk constituents, lactoperoxidase or sialyl lactose. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Kobe, Japan. July 1-5, 2005.
13. Moriuchi M, Moriuchi H. Alpha-fetoprotein inhibits HIV-1 infection: Implications for mother-to-child transmission. 1st Congress of Asian Society for pediatric Research. Tokyo, Japan. November 24-26, 2005.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 「乳清由来 lactoperoxidase および sialyl lactose の HIV 感染抑制効果」について、共同研究施設である雪印乳業株式会社より特許申請中。



HAART 下における抗 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）

研究要旨

我々は 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。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。一方、広範囲の分離株を中和しうる中和単クローン抗体の臨床開発には、中和エスケープウイルスの研究は不可欠である。我々は、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い R5 ウイルス(JR-FL)の逃避ウイルス誘導を試みた。その結果、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の-GPGR-が-GPER-に変異したウイルスが誘導された。変異ウイルスは既存の抗 HIV 薬である、PI や RTI に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤や rsCD4 や抗 CCR5 抗体(2D7)に対しては、感受性になっていた。また、KD-247 と CCR5 阻害剤の強力な相乗効果が *in vitro* で確認されており、今後臨床応用に向け有力な組み合わせの一つとして期待できる。

A. 研究目的

我々は、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。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「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 50 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。我々は、化血研との共同で HIV のエンベロップ蛋白 (gp120) に対する広範囲ウイルス中和抗体 (KD-247) を作製し、現在臨床応用に向け準備中である。新規の抗ウイルス剤で問題となるのは、臨床使用時にどのような耐性（もしくは逃避）ウイルスが出現するのかということと、どのような薬剤との組み合わせが有効であるか（もしくは悪影響があるか）ということである。そこで、今回我々は、新規に開発した *in vitro* における中和抗体の耐性誘導システムを用いて、これまで Cell Line では困難であった R5 ウイルスの *in vitro* での中和抗体逃避ウイルスを比較的簡便に誘導し、*in vivo* での耐性ウイルスの予測を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 自己由来の分離株に対する中和抗体の測定

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。

2. 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。

3. 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 μ l の分離ウイルス (500TCID₅₀) を 50 μ l 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 を用いて測定した。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。

4. 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。

5. 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) をノーマリゼーションのためそれぞれの患者の CD4: 8 ratio にて除した。

6. 制御性 T 細胞 (regulatory T cell; TR) 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 $^{\circ}$ 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。

7. KD247 に対する中和逃避ウイルスの誘導

KD-247 単クローン抗体存在下に、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い *in vitro* で R5 ウイルス (JR-FL) の逃避ウイルス誘導を試みた。その結果得られた逃避ウイルスを用いて、抗体の耐性を PM1/CCR5 細胞を用いた MTT assay により判定した。また同時に、得られた逃避ウイルスの各 passage における envelope の sequence を行った。Sequence の結果から、逃避能付与責任変異部位の特定を行い、site-directed mutagenesis 法により変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスを作製した。この pseudotype ウイルスを GHOST-hi5 細胞に感染させて、様々な抗体濃度でルシフェラーゼ活性を測定した (single-round replication assay)。また、プロテアーゼ阻害剤 (PI)、核酸系逆転写酵素阻害剤 (NRTI) などや、現在開発が進められている CCR5 阻害剤において逃避ウイルスにおける感受性の違いを測定した。

(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にて審査され、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 500µg/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) 低いレベルの HIV-RNA のリバウンド (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。中和抗体が弱いか検出されない 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 感染症例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 IFN 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)。これらデ

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 .

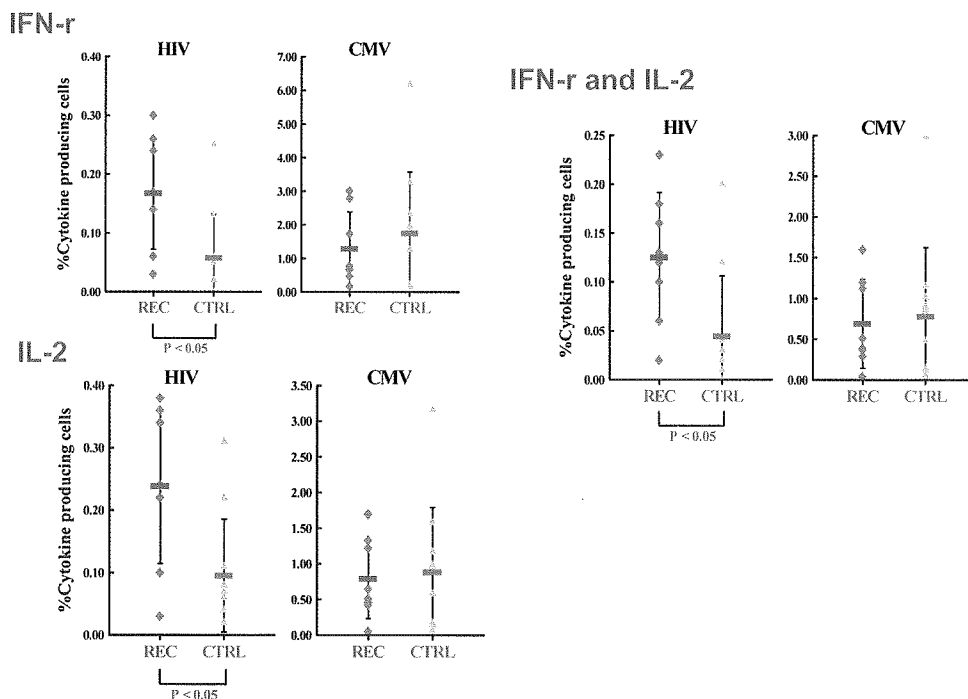


図 1. 中和抗体活性増加症例 (REC) における HIV 特異的ヘルパー T 細胞活性の再構築

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。

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

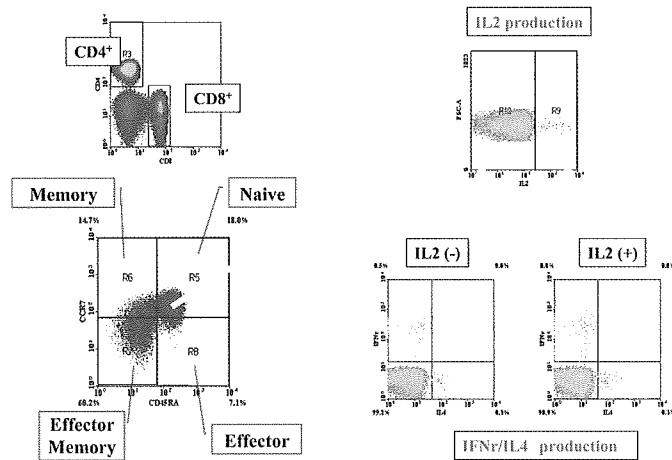


図 2. 各分化段階における抗原特異的 CD4+ T 細胞反応の測定

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、LSRII(BD)を用いて検討した。

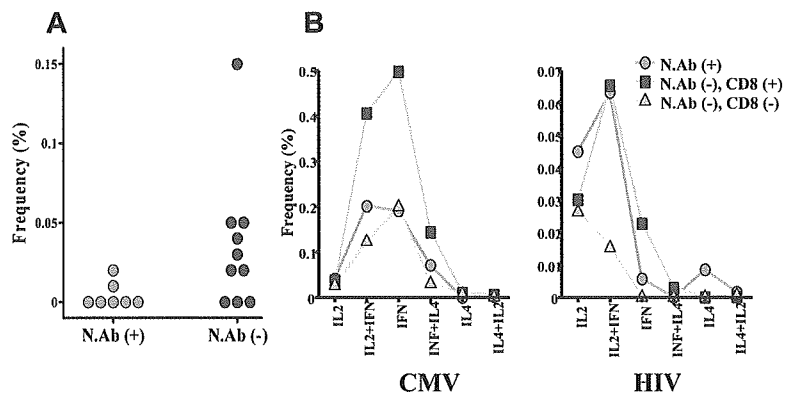


図 3. 抗原特異的に IFN- γ と IL-2 を産生する CD4+ T 細胞の頻度

図 3A; 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 3B; 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。

抗体再構築群にのみ観察された。

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 50 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。

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、

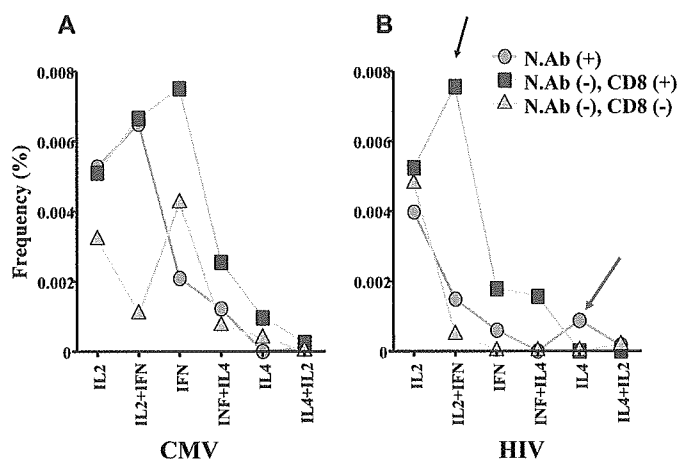


図 4. Naive 分画におけるヘルパー T 細胞活性

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。

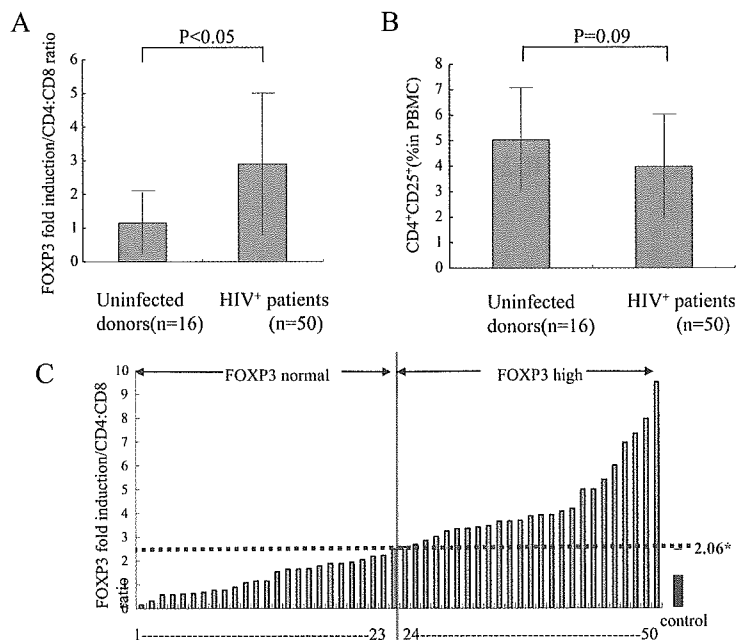


図 5. HIV 感染症例では FOXP3 の転写量が多い

(A) HIV 感染症例 50 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。(B) 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。(C) HIV-1 感染症例における FOXP3 mRNA の発現。50 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。27 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)。

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 27 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-5C)。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_r の産生の増加を観察した。FOXP3 がコントロール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_r 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_r の産生量の増加が見られた (図-6)。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 (data not shown)。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_r 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。我々はさらに T_R がヘルパー T 細胞の各分化段階のどこを抑制しているかについて検討を加えた。CD25 陽性細胞を除いた場合のサイトカイン産生細胞の増加率を比べたところ、CMV を抗原として用いた場合、メモリーのどの段階についても抑制性であると考えられたが、HIV 抗原を用いた場合、その効果はエフェクターのみでみられるものであった (図-7)。

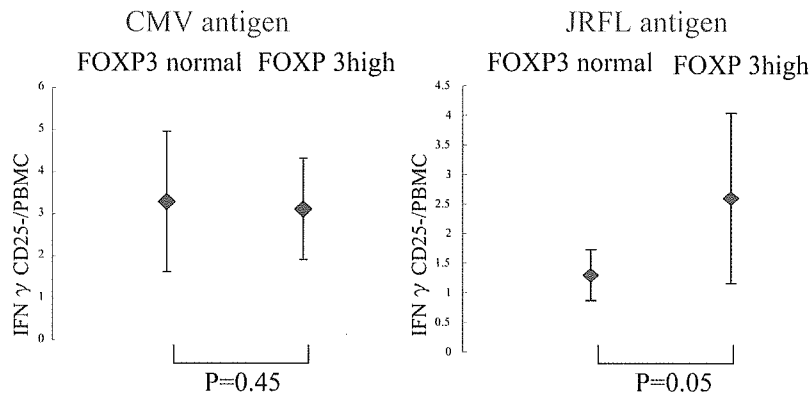


図 6. FOXP3 high 群では HIV 抗原に反応して IFN_r を産生するヘルパー T 細胞を制御している制御性 T 細胞活性が高い FOXP3 high 群と FOXP3 normal 群を比較すると、どちらの群でも CD25-PBMC を刺激した場合のほうが IFN_r 産生の有意な増加がみられるが、その増加率で比べると、HIV 抗原で刺激した場合に有意な増加が見られた。

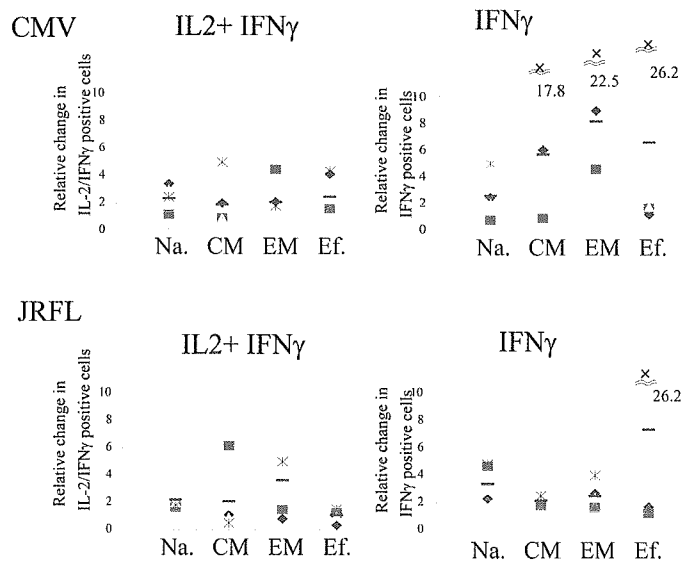


図 7. HIV に反応する制御性 T 細胞(T_R)は effector T 細胞に作用している

制御性 T 細胞(T_R)がヘルパー T 細胞の各分化段階のどこを抑制しているかについて、CMV の場合と比較して詳しく検索した。rIFN 産生抑制をしている TR は CMV の場合 TM, TEM, TE のすべてに作用しているのに対し、HIV では TE のみに抑制活性が見られた。Na:TN, CM:TCM, EM:TEM, Ef.:TE.

3. 広範囲のウイルス株に反応する単クローン抗体

KD-247 に対する中和逃避の誘導

CCR5 高発現 PM1 細胞 (PM1/CCR5) に KD-247 で前処理した JR-FL を感染させ、5 時間培養後に抗体をワッシュアウトするという実験系で中和逃避ウイルスを誘導した。逃避ウイルス誘導の結果、抗体濃度を 1 μ g/ml から始めて 600 μ g/ml(6-passage)まで上げたところで、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の-GPGR-が-GPER-に変異したウイルスが認められ、

1mg/ml(8-passage)まで抗体濃度を上げると、8 割以上のウイルスが-GPGR-から-GPER-に置き換わっていた (図-8、図-9)。抗体濃度を 2mg/ml まであげてこの後 12-passage まで培養を継続したが tip 部位に変異を持つウイルスの占める割合は変わらなかった。8-passage の上清中のウイルスを用いて、KD-247 に対する感受性を MTT assay で測定すると、野生株の JR-FL の IC₅₀ が 6.3 μ g/ml であったのが、8-passage ウイルスは、>100 μ g/ml であり、KD-247 の

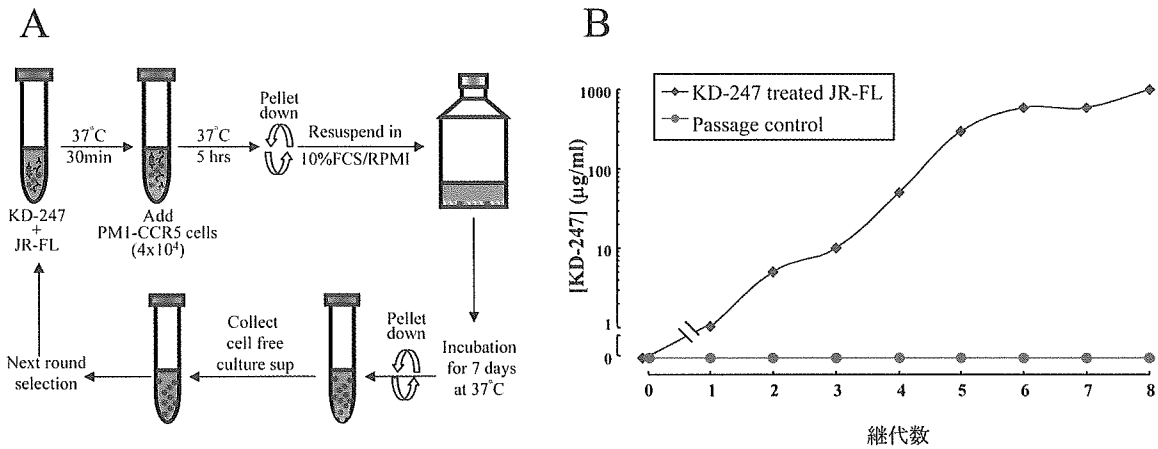


図 8. *In vitro* における KD-247 逃避ウイルスの誘導。

(A) CCR5 高発現 PM1 細胞(PM1/CCR5)に KD-247 で前処理した JR-FL を感染させ、5 時間培養後に抗体をワッシュアウトするという実験系で中和逃避ウイルスを誘導した。KD-247 の濃度を徐々に上げながら CPE を指標に継代した。コントロールとして抗体非存在下で JR-FL 株を PM1/CCR5 細胞に同様に継代した。(B) 最終的に 8 passage で KD-247 の濃度が 1mg/ml まで到達した。

JRFL pre	-CTRPNNTRKSIHIIGPGR	AFYTTGEIIGDIRQAHC-
In vitro selection with KD-247		
P1(1 μ g)	-	-
P5(300 μ g)	-	-
P5(300 μ g)	-	Y-
P5(300 μ g)	-	R.
P5(300 μ g)	-	T.
P6(600 μ g)	-	-
P6(600 μ g)	-	E.
P7(600 μ g)	-	E.
P7(600 μ g)	-	E.
P7(600 μ g)	-	T.
P8(1mg)	-	E.
P8(1mg)	-	A.
P8(1mg)	-	E.
No antibody control		
P8(Ab-)	-	-
P8(Ab-)	-	R.

図 9. 誘導した KD-247 逃避ウイルスの V3 領域のシークエンス。

1-5 passage までは Env V3 シークエンスに変異は見られなかったが、6 passage から V3-tip に G314E のアミノ酸変異が認められ、それ以降は 70 % 以上が変異ウイルスに置き換わっていた。

中和に対して完全耐性となっていた (図-10)。この逃避ウイルスは既存の抗 HIV 薬である、プロテアーゼ阻害剤 (NFV、IDV、APV、SQV) や核酸系逆転写酵素阻害剤 (ddI、3TC) に対しては感受性の変化は見られなかったが、CCR5 阻害剤 (TAK-779、SCH-C、AK-602)、rsCD4 や anti-CCR5 monoclonal

抗体 (2D7) に対しては、感受性になっていた (表-2)。これらの傾向は、変異アミノ酸を導入したエンベロープを持つ pseudotype ウイルスによる single-round replication assay においても、同様な結果が確認された。これらのデータから V3-tip に反応する KD-247 に対するエスケープ変異はウイルスの

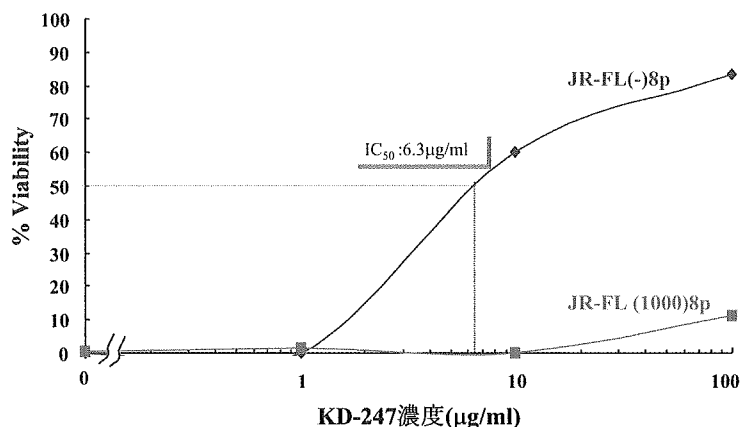


図 10. 逃避ウイルスの KD-247 に対する感受性試験。

誘導した KD-247 逃避ウイルス [JR-FL(1000)8p] とコントロールウイルス [JR-FL(-)8p] を用い MTT assay で KD-247 に対する感受性を調べたところ、逃避ウイルスは KD-247 が 100 μg/ml まで上げてても中和しなかった。

表 2. KD-247-逃避ウイルスの各種抗ウイルス剤に対する感受性試験の野生株との比較

Antibody or inhibitor		IC ₅₀ ^a		Fold change
		JR-FL(-)8P	JR-FL(1000)8P	
KD-247	(μg/ml)	6.3	>100	>16
TAK-779	(nM)	210	40	0.19
SCH-C	(nM)	29	7	0.24
AK-602	(nM)	0.53	0.08	0.23
ddI ^b	(μM)	1.9	2.2	1.2
3TC	(μM)	0.32	0.42	1.3
NFV	(μM)	0.045	0.045	1.0
IDV	(μM)	0.028	0.025	0.89
APV	(μM)	0.032	0.021	0.66
SQV	(μM)	0.0038	0.0035	0.92
rsCD4	(μg/ml)	3.7	0.55	0.15
anti-CD4 mAb (RPA-T4)	(μg/ml)	0.01	0.03	3.0
anti-CCR5 mAb (2D7)	(μg/ml)	0.21	0.07	0.33
MIP-1α	(μg/ml)	0.0024	0.0019	0.79
MIP-1β	(μg/ml)	0.28	0.13	0.46
RANTES	(μg/ml)	0.025	0.0035	0.14

^a PM1-CCR5 cells (2×10^3) were exposed to 100 TCID₅₀ of JR-FL(-)8P or JR-FL(1000)8P were cultured in the presence of various concentrations of the mAbs or inhibitors. The IC₅₀ values were determined by using the MTT assay on day 7 of culture. All assays were conducted in duplicate. The values shown are representatives of two or three separate experiments.

^b Abbreviations: ddI, didanosine; 3TC, lamivudine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir; APV, amprenavir; SQV, saquinavir;