

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-34828

(P2015-34828A)

(43) 公開日 平成27年2月19日(2015.2.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	H
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	B

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2014-222487 (P2014-222487)	(71) 出願人	508029653
(22) 出願日	平成26年10月31日 (2014.10.31)		アンステイテュ・パストゥール
(62) 分割の表示	特願2011-526500 (P2011-526500)		フランス・F-75724・パリ・セデック
	の分割		クス・15・リュ・デュ・ドクトゥール・
原出願日	平成21年9月11日 (2009.9.11)		ルー・25-28
(31) 優先権主張番号	61/096,135	(74) 代理人	100108453
(32) 優先日	平成20年9月11日 (2008.9.11)		弁理士 村山 靖彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HMGB1依存型誘発のHIV-1複製および持続の調節によるヒト免疫不全ウイルス感染の監視および阻害

## (57) 【要約】

【課題】HMGB1レベルおよび/またはHMGB1に対して特異的な抗体を測定することを含む診断および予後診断の方法、ならびに、HMGB1の活性を調節することにより、ヒト免疫不全ウイルス感染症を治療する、またはその重症度を低下させる、抗体および薬剤に基づいた方法を提供すること。

【解決手段】本発明は、High mobility box 1(HMGB1)タンパク質がナチュラルキラー(NK)細胞と相互作用する能力を阻害する物質を含む、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を調節するための組成物および方法、ならびに、HMGB1に結合する抗体、およびグリチルリジン等の薬剤を含む治療組成物、ならびに、生体試料においてHMGB1またはHMGB1に特異的な抗体の検出または定量を含む、HIV感染を検出または監視するための方法を提供する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

HIVに感染した対象におけるHIV感染を監視するためのインビトロの方法であって、前記対象から得た生体試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質を定量する段階を含み、定量の標的となる前記HMGB1タンパク質は、全HMGB1またはその免疫複合体画分である、方法。

**【請求項 2】**

HIVに感染した前記対象由来の生体試料を、High mobility group box 1(HMGB1)タンパク質に免疫的に結合する抗体と接触させる段階を含む、請求項1に記載のインビトロの方法。

10

**【請求項 3】**

HIVの感染が認められる対象から得た生体試料中のHIVウイルス負荷を監視するインビトロの方法であって、前記対象から得た生体試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質を定量する段階を含み、定量の標的となる前記HMGB1タンパク質は、全HMGB1、またはその循環画分(循環HMGB1)、またはその免疫複合体画分のいずれかであり、HMGB1タンパク質が多いほどウイルス負荷が大きい、方法。

**【請求項 4】**

前記定量されたHMGB1を、HIVに感染していない対象から得た生体試料由来のHMGB1の量と、または異なる時点で同一患者から得た生体試料由来のHMGB1の量と比較する、請求項1から3のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

20

**【請求項 5】**

前記対象の急性および/または慢性炎症を排除または制御するための少なくとも1つの診断テストをさらに含む、請求項1から4のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

**【請求項 6】**

HIVに感染した対象におけるHIV感染症の治療の効果を監視するためのインビトロの方法であって、(a)治療中の異なる時点において前記対象から得た試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質を定量する段階であって、定量の標的となる前記HMGB1タンパク質が、全HMGB1、またはその循環画分(循環HMGB1)、またはその免疫複合体画分のいずれかである、定量する段階と、(b)対象に施した治療の効果を測定する段階とを含む、方法。

30

**【請求項 7】**

得られた結果を、治療開始前の同一対象の試料と比較する段階をさらに含む、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

HIVに感染した患者における、AIDSの進行状態またはAIDSへの進行状態のいずれかのインビトロの予後診断方法であって、前記対象から得た生体試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質を定量する段階を含み、定量の標的となる前記HMGB1タンパク質は、全HMGB1、またはその循環画分(循環HMGB1)、またはその免疫複合体画分のいずれかであり、HMGB1タンパク質のレベルが高いほどAIDSまたは進行状態のAIDSを発症するリスクが高い、方法。

40

**【請求項 9】**

定量されたHMGB1タンパク質が全HMGB1タンパク質であり、前記方法が、HMGB1タンパク質で形成された免疫複合体の解離を可能とする条件下で、酸処理によって試料を処理する段階を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

**【請求項 10】**

前記試料を、一次感染もしくは急性感染中または慢性感染中に得る、請求項8に記載のインビトロの方法。

**【請求項 11】**

前記試料が、血液、血漿、血清、唾液、PBMC、または他の体液である、請求項1から10のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

50

## 【請求項 1 2】

前記HIVがHIV-1またはHIV-2である、請求項1から11のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 1 3】

前記対象がヒトである、請求項1から12のいずれか一項に記載のインビトロの方法。

## 【請求項 1 4】

試料において全High mobility group box 1タンパク質(HMGB1)を定量するためのキットであって、

a)HMGB1タンパク質に特異的な抗体、またはHMGB1タンパク質に結合することができるそのフラグメント、および

10

b)患者から採取した場合に試料中に存在するHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるのに適した酸性解離溶液、を含む、キット。

## 【請求項 1 5】

中和緩衝剤をさらに含む、請求項14に記載のキット。

## 【請求項 1 6】

HMGB1/特異的抗体複合体に結合する二次抗体をさらに含む、請求項14に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

20

HMGB1レベルおよび/またはHMGB1に対して特異的な抗体を測定することを含む診断および予後診断の方法。HMGB1の活性を調節することにより、ヒト免疫不全ウイルス感染症を治療する、またはその重症度を低下させる、抗体および薬剤に基づいた方法。

## 【背景技術】

## 【0002】

HIV-1感染の初期段階では、自然免疫の重要なエフェクターである、NK細胞およびDCが局所に集まり、活性化する。粘膜感染の最初の数時間および数日間で、HIV-1は上皮性関門と交差し、粘膜組織でCCR5を発現するDC、マクロファージ、およびT細胞に感染し、感染を開始する<sup>1,2</sup>。DCは、HIV-1の捕獲および伝播を促進するCD4、CCR5、DC-SIGN<sup>3</sup>および他のC-型レクチン受容体(CLR)を発現する<sup>4,5</sup>。未成熟DC(iDC)はCLRによってHIV-1を捕獲し<sup>6</sup>、捕獲されたウイルスは内部移行し、感染性シナプスを形成して、近くにあるCD4 T細胞に急速に伝染する<sup>7,8</sup>。DC-T細胞コンジュゲートは、CD4 T細胞中の増殖性感染を促進し<sup>9</sup>、流入領域リンパ節への感染伝播を促進し、続く他のリンパ系組織区画も、感染したマクロファージおよびCD4 T細胞と一緒にウイルスを運搬するDCによって感染する<sup>10</sup>。

30

## 【0003】

ウイルス取込み後、iDCは二次リンパ組織内のT細胞領域へ遊走するが、これは成熟過程に関連しており、この過程を経て成熟したDC(mDC)は抗原特異的応答を刺激できるようになる<sup>11</sup>。近年、DCの運命は自己由来のNK細胞に高度に依存することが見出された<sup>12</sup>。NK-iDC相互作用はNK細胞の活性化を引き起こし、次いでそれぞれの濃度に依存して、DCの成熟または死滅を誘導する<sup>13,14,15</sup>。成熟するDCは、IL-12とIL-18等のサイトカインをいくつか分泌するが、このサイトカインはNK細胞の活性化および細胞毒性の強力な誘導質として作用する<sup>16,17,18,19,20</sup>。次いで、いったん活性化されたNK細胞は、DC成熟を誘導するIFN- とTNF- を産生する。この事象は、iDCで発現したリガンドによるNKp30の関与<sup>17,21</sup>、およびCD94/NKG2A抑制性受容体のリガンドであるHLA-EのiDCでのダウンレギュレーションに依存する<sup>22</sup>。iDCから放出されたIL-18により、シナプス間隙において活性化されたNK細胞が、DCの成熟を誘導し、溶解からDCを保護するHMGB1を分泌するという別のメカニズムが提唱された<sup>20</sup>。HMGB1は、ほとんどすべての真核細胞の中にある核内タンパク質であり、ヌクレオソーム形成の安定化のために機能し、転写因子様のタンパク質として作用していて、いくつかの遺伝子の発現を制御する<sup>23,24</sup>。HMGB1は壊死細胞から放出されるが、炎症性の刺激応答で活性化したマクロファージ<sup>25</sup>およびNK細胞<sup>20</sup>からも分泌され、ダメ

40

50

ージ関連分子パターン分子(DAMP)の主要な表現型の1つである<sup>26</sup>。HMGB1は、免疫系における重大なサイトカインであり、炎症性白血球の輸送を促進し、DCの成熟に重要であること、リンパ節に到達し、抗原特異的T細胞の増殖を維持すること、およびT-ヘルパー1表現型への分極を促進することが最近発見された<sup>27,28</sup>。

【0004】

ウイルス感染中のNK-DC相互作用に関するメカニズムはよく分かっていない。最近、マウスのCMV(MCMV)感染において、MCMVに感染したDCは、インビトロで同質のNK細胞を活性化でき、またインビボでNK細胞依存型の排除を増強でき<sup>29</sup>、ウイルス複製の制御におけるNK-DCクロストークの重要な役割が実証されたことが報告された。HIV感染においては、非ウイルス血症患者にはない不完全なNK-DC相互作用がHIV-1感染ウイルス血症患者において見出され、iDCでのNK細胞除去における欠陥と同様、NK-DC相互活性化および成熟の過程での異常という特徴を有していた<sup>30</sup>。HIV-1感染iDCの成熟、機能、およびウイルス複製に対する感受性におけるNK-DCクロストークの役割を評価した。HIV-1感染DCの成熟は活性化NK細胞により引き起こされるが、これは、NK細胞とのクロストーク後にTh1分極を誘導する成熟感染DCの著しい障害に関連することが発見された。さらに、NK細胞とHIV-1感染iDCとの間のクロストークにより、DCにおけるウイルス複製およびプロウイルスDNA発現が劇的に上昇した。この過程は、主に、NK-DCクロストークの結果、NK細胞とDCの両方から放出されたHMGB1が引き起こしていた。

10

【0005】

HIV-1は、DCの利用方法を進化させて、ウイルス伝播を促進し、抗ウイルス免疫を回避できるようになった。そのDCの運命はNK細胞に依存している。本発明者らは、以下にHIV-1感染DCの運命に対するNK-DCクロストークの影響を詳述する。活性化NK細胞は感染DCの成熟を効率的に引き起こすが、これはTh1分極を誘導する成熟DCの強い障害に関連していた。さらに、NK細胞と感染DCとの間のクロストークにより、DCにおけるウイルス複製およびHIV-DNAが劇的に上昇した。HMGB1は、この過程において重要であり、グリチルリジンまたは特異的抗体によるHMGB1活性の阻害により、DCにおけるHIV-1複製が抑制された。本発明者らは、ウイルス伝播を効率的に促進するため、HIVがDCを「ハイジャック」する方法に関する本発明者らの新しい知見により、HIV感染を阻害する新しい方法、HIV感染を診断し監視する新しい方法、HIV感染、ウイルス負荷、およびHIV感染症に対する治療の有効性を監視する新しい方法、およびAIDSの進行状態またはAIDSへの進行状態の予後診断を行う新しい方法がどのようにして生み出されたかを以下に記載する。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Lotze, et al., Nature Reviews, Immunology 5:351(2005)

【非特許文献2】Mollica, et al., Chem. Biol. 14:431 (2007)

【非特許文献3】Gaillard, et al., PLOS One 3(8) e2855, pages 1-9 (2008)

【非特許文献4】Urbonaviciute et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. J Leukoc Biol. 2007 81:67-74

【非特許文献5】Launay et al. Vaccine 2009, 27:1184-1191

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の態様は、以下の治療、予後診断および診断的適用を含む。

【課題を解決するための手段】

【0008】

患者においてHMGB1のブロックが、HIV複製を抑制し、DCにおけるHIV貯蔵を減少させ、疾患進行を遅らせるのに役立つ可能性がある。したがって、本発明の1つの態様は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を調節する方法であって、HIVに感染した対象を、HMGB1に結合する作用物質、特にHigh mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に結合する抗体、も

50

しくはHMGB1結合抗体フラグメント、グリチルリジン、またはHMGB1に結合できる単離されたRAGEもしくはRAGEフラグメントと接触させる段階を含む方法に関する。本発明はまた、HIVに感染した対象におけるHIV感染症を治療するための薬剤として使用される、HMGB1に結合する作用物質、特に、High mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に結合する抗体、もしくはHMGB1結合抗体フラグメント、グリチルリジン、またはHMGB1に結合できる単離されたRAGEもしくはRAGEフラグメントに関する。治療において使用され得る特定の作用物質は、HMGB1を特異的にブロックする抗体、またはそのような抗体のフラグメント、特にHMGB1を特異的にブロックする前記能力を保持する抗体のフラグメントである。フラグメントの例としては単鎖抗体、またはFab、Fv、およびFab<sub>2</sub>フラグメントがある。特定の一実施形態では、前記抗体はモノクローナル抗体であり、または前記フラグメントはモノクローナル抗体の一部である。別の特定の実施形態では、前記抗体またはフラグメントはヒト抗体またはヒト化抗体であることが好ましい。「特異的にブロックする」とは、抗体またはそのフラグメントが、HMGB1タンパク質に結合する能力を有しており、その活性を妨げるか、または減少させることを意味し、特に、その受容体の少なくとも1つ、特にRAGE受容体における結合を妨げることを意味する。特定の一実施形態では、本発明の抗体またはそのフラグメントのブロック挙動の発生を、HMGB1とその受容体の少なくとも1つとの結合を分析することにより、ならびに/または樹状細胞(DC)成熟(HIV感染または非感染)における、DCでのHIV複製における、および/もしくはDCでのHIV DNA発現における、HMGB1の活性を分析することによって検査してもよい。HMGB1とその受容体のうちの1つ(特にRAGE)との結合の低下、または上記で定義したHMGB1の活性の低下が、50%を超える、60%を超える、70%を超える、80%を超える、または90%を超える場合に、抗体またはそのフラグメントは、HMGB1タンパク質を特異的にブロックすると見なされる。

10

20

**【0009】**

本発明の文脈において、用語「特異的に」または「特異的な」は、抗体またはそのフラグメントが、HMGB1タンパク質を認識し結合することができ、他の細胞タンパク質、特に免疫系に關与する他の細胞タンパク質を顕著に認識、結合しないことが好ましく、または特にNK-DCクロストークの状況では他の細胞タンパク質を顕著に認識、結合しないことを意味する。別に述べない限り、本適用において、抗体に関する説明は、上記で開示したようなそのフラグメントにも適用される。

**【0010】**

特定の作用メカニズムによるのではないが、この方法は、樹状細胞におけるウイルス複製およびウイルス貯蔵への補充を減少させることにより機能し得る。したがって、本発明はまた、HIVに感染した対象のHIV貯蔵細胞を減少させるための薬剤として使用する、上述のようなHMGB1に結合する作用物質に関する。HIV貯蔵細胞は、HIVに感受性である、および/またはHIVに感染可能なあらゆる細胞であり得る。特定の実施形態では、HIV貯蔵細胞はプロウイルスDNAを有する。HIV貯蔵細胞は血液、固体組織、または粘膜等の生物組織由来であり、特に、脳、肝臓、脾臓、扁桃腺、リンパ節、または消化管関連リンパ系組織(GALT)由来である。特定の実施形態では、これらの細胞は、末梢血液細胞、T細胞、特にTC D4細胞等のリンパ球系細胞、またはマクロファージもしくは樹状細胞等の単球由来細胞である。

30

40

**【0011】**

ヒト免疫不全ウイルスには、HIV-1およびHIV-2系統と同様、サルおよび他の哺乳類に適応したHIV系統を含むウイルスの他の異型も含まれる。

**【0012】**

本発明は、またHIV-2およびサル免疫不全ウイルス(SIV)を含む他のレトロウイルスによって引き起こされた感染の治療、診断、および監視にも適用する。HIVのようなレトロウイルスによって感染した対象または患者には、ヒト、サルおよび他の類人猿、ならびに、HIV感染のモデルとして使用される他の哺乳動物が含まれる。特定のHIV-1系統にはR5 HIV-1系統およびX4 HIV-1系統が含まれる。

**【0013】**

50

HMGB1は核に現れる、よく知られたタンパク質で、サイトカインとしても知られている。HMGB1の物理的および機能的特性は、Lotzeら、Nature Reviews, Immunology 5:351(2005)により開示されており、これを参照して組み込む。

【0014】

HMGB1に結合する抗体は既知であり、当技術分野でよく知られた方法によって産生できる。市販の抗HMGB1抗体の例としては、ヒトHMGB1に対するウサギ一次ポリクローナル抗体(Abcam参照番号18256)があり、これはヒトHMGB1のC末端150残基由来のKLHコンジュゲート合成ペプチドに対して作用する。これらの方法は、HMGB1のポリクローナル抗体、およびHMGB1またはHMGB1の特定フラグメントのモノクローナル抗体を産生する方法を含んでいる。治療適用において使用される抗体は、ブロック特性を有し、例えば、特に、感染した樹状細胞におけるHMGB1誘導HIV複製を妨害する。これらの抗体は、投与される対象と同じ種に由来することが好ましく、投与される同じ種のHMGB1を認識し、またはHMGB1へ誘導される。これらの抗体にはIgA、IgGまたはIgMイソタイプ等の異なったイソタイプを有し得る。HMGB1に結合する抗体フラグメントを使用してもよいが、これにはFab、Fab<sub>2</sub>、単鎖抗体、またはそのフラグメントが含まれる。

10

【0015】

ヒト化抗HMGB1モノクローナル抗体をヒトにおける治療に使用してもよい。これを当技術分野においてよく知られた方法で産生してもよい。ウイルス複製を減少させ、かつ貯蔵細胞の数を制限するために、これらの抗体をウイルス負荷が高く、かつHMGB1レベルが高いHIV感染者に注射できる。このようなヒト化抗体は、救済療法もしくは代替療法として、または抗レトロウイルス薬と併用して使用できる。

20

【0016】

本明細書で定義したようにHMGB1に結合する抗体、またはそのフラグメントは対象においてHMGB1に結合し、HIV複製または感染を調節するために対象に投与し得る。投与方法には、静脈内(i.v.)、皮内、皮下(s.c)、脳内、経粘膜、経皮、吸入(例えば気管内、肺内、また気管支内)、鼻腔内、経口、サバツカル(subuccal)、経皮、および直腸投与があるが、これらに限定されない。

【0017】

炎症反応ならびに感染DCの成熟および生存に対する影響を考慮して、慢性ウイルス感染を治療するために、HMGB1の産生または放出の標的化、または、その受容体、特にDCでのRAGE、との相互作用の防止を利用してもよい。したがって、HMGB1受容体(例えばRAGE)に結合し、HMGB1とのその相互作用を阻害する抗体もしくは抗体フラグメント、またはDCにおけるHMGB1受容体(例えばRAGE)とHMGB1との機能的相互作用を阻害する可溶性HMGB1受容体タンパク質(例えばHMGB1と結合できる可溶性RAGEタンパク質またはフラグメント)等の作用物質を使用してもよい。DCでRAGEに結合し、DCとHMGB1との機能的相互作用を阻害するHMGB1の部分も意図される。

30

【0018】

発明者らは、グリチルリジンがDCにおけるHMGB1依存型のHIV複製を阻害できることを示した。グリチルリジン療法は副作用がほとんど無く、IFN耐性のC型活動性慢性肝炎を有する患者での肝細胞癌の防止にインビボで使用することに最近成功している。この療法は、検出可能なウイルス負荷を有し、かつHMGB1レベルが増加している慢性HIV-1感染患者に使用し得るが、多剤耐性ウイルスが原因である場合には救済療法として、HIV特異的抗レトロウイルス薬の使用に対する(毒性が少なく、ウイルスそれ自体ではなく炎症性の微小環境に作用する)代替療法として、または、抗レトロウイルス薬では治療が成功しなかった場合にこの薬剤との併用療法のいずれかとして使用し得る。

40

【0019】

したがって、本発明のさらなる態様は、HIV-1感染を含むヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染を調節するための方法であって、HIVに感染した細胞または対象を、High mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に結合する作用物質、特に樹状細胞(DC)におけるHIV複製のナチュラルキラー(NK)細胞依存型誘発を阻害するある量の作用物質と接触させる段階を含む

50

。本発明はまた、HIVに感染した細胞または患者のヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染(HIV-1感染を含む)の調節に使用される、High mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に結合する作用物質、特に樹状細胞(DC)におけるHIV複製のナチュラルキラー(NK)細胞依存型誘発を阻害する作用物質に関する。

【0020】

グリチルリジンはそのような作用物質の1つであり、HMGB1への結合に有用なグリチルリジンのモードおよび濃度がMollicara、Chem. Biol. 14:431 (2007)に開示されており、これを参照して組み込む。グリチルリジンに加えてHMGB1に結合する他の作用物質または化合物も使用され得る。HMGB1が結合する天然リガンドの可溶性リガンドまたはセグメントを使用してもよい。そのようなリガンドを、HMGB1が結合する白血球または抗原提示細胞から得てもよい。

10

【0021】

HIVに感染した、またはそのリスクがあるヒト患者を、患者の免疫系の維持のため、本明細書で開示された抗体、抗体フラグメント、および他のHMGB1に結合する作用物質で、治療してもよい。HMGB1を特異的にブロックする抗体、またはHMGB1を特異的にブロックする前記能力を保持するフラグメントでの治療も含まれる。多くの抗レトロウイルス薬は相当な毒性を引き起こすが、グリチルリジンは無毒であるため、本発明の治療は従来の抗HIV治療における有害な副作用を低減できる。HMGB1を認識する抗体ベースの産物にも、多くの抗HIV薬が有する毒性が無く、HIV治療の副作用を低減するためにも使用できる。同様に、従来のレトロウイルス薬治療に耐性、または多剤耐性となったヒト患者の進行治療を、HMGB1に結合する抗体産物および他の作用物質を含む本発明の方法で治療できる。グリチルリジン(またはヒト化遮断抗HMGB1抗体)と、単独では低用量で使用される抗レトロウイルス薬との併用療法もまた意図される。

20

【0022】

これらのHMGB1結合剤または化合物は、HIV感染に対して単独で、もしくは、少なくとも1つのさらなる活性化合物と併用して使用され得、またはHIV感染治療のため使用される薬剤および医薬品等の他の作用物質との併用で投与され得る。そのような薬剤および医薬品には、2つのヌクレオシドアナログ逆転写酵素阻害剤(NARTIまたはNRTI)、プロテアーゼ阻害剤、ならびにAZTおよびインジナビル等の非核酸系逆転写酵素阻害剤(NNRTI)が含まれる。

30

【0023】

本発明はまた、ヒト対象への投与に適した無菌の組成物を含み、これには、High mobility group box 1(HMGB1)タンパク質に結合する、単離された抗体もしくは抗体フラグメント、他のHMGB1結合剤、および/またはグリチルリジン、ならびに薬学的に許容されるキャリア、賦形剤、または希釈剤がある。これら組成物には、上述したような、ヒト免疫不全ウイルス感染症治療のために使用される、前記抗体、抗体フラグメントおよび/もしくはグリチルリジン以外の他の薬剤または医薬品が含まれてもよい。一般的に、HIVに感染したヒト患者のための治療ツールとして使用される抗体は、HMGB1の活性をブロックするヒト型またはヒト化抗体であるべきである。

【0024】

本発明の他の態様には、ヒトにおけるHIV感染症を治療するための薬剤として使用されるグリチルリジン、HIV感染症の治療的適用のための医薬品の製造におけるグリチルリジンの使用、およびHIV感染症の治療的適用のための医薬品の製造における、単離されたヒト化遮断HMGB1特異的抗体または抗体フラグメントの使用を含む。

40

【0025】

また本発明は、対象から得た生体試料に含まれるHMGB1に特異的な全抗体を定量するためのインビトロの方法であって、a)試料中に存在するHMGB1を含む免疫複合体を解離させるために、酸処理、好ましくは低pHのグリシン1.5Mで試料を処理する段階と、b)前記処理された生体試料を天然HMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させる段階と、c)HMGB1に特異的な全抗体を定量する段階とを含む方法に関する。

50

## 【0026】

好ましい実施形態において、酸処理は、試料においてHMGB1タンパク質が免疫的に結合した抗体から、この抗体の結合能力を変化させずにHMGB1タンパク質を分離するために選択された、低pH、好ましくはpH1~3を有する酸性解離溶液と試料を接触させることからなる。特定の実施形態では、酸性解離溶液は、低pH、好ましくはpH1~3(例えば1.85)のグリシン(例えば1.5M)である。その後、酸処理を中和緩衝剤(トリス等、例えば1.5Mトリス、pH9)により停止する。別の好ましい実施形態において、上記の1つと併用して、または併用せずに、酸性解離溶液中でのインキュベーションを20~37℃の温度で、好ましくは25℃で行い、かつ/または中和ステップを水中で行う。

## 【0027】

本出願において、用語「定量する」は、用語「定量化する」およびHMGB1タンパク質または特異的抗体のあらゆる適切で有用な測定を包含する。

## 【0028】

本発明はまた、HIVの感染が認められる対象から得た生体試料中のHIV感染を監視するインビトロの方法であって、この患者から得た生体試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)に特異的な抗体を定量する段階を含み、定量の標的となる抗体は、HMGB1、またはその循環画分(循環抗体)、またはその免疫複合体画分のいずれかに特異的な全抗体である、方法に関する。

## 【0029】

本明細書で開示された、HIV感染、ウイルス負荷、または治療の効果を監視する方法、および予後診断の方法は、HMGB1に特異的な循環(残存)抗体の定量、HMGB1に特異的な全抗体の定量化、または、HMGB1/特異的抗体の免疫複合体の画分の定量のいずれかに基づいて実行され得る。

## 【0030】

特定の一実施形態では、これらすべての方法は、循環性の特異的抗体または全特異的抗体の定量のいずれかに基づく。

## 【0031】

HMGB1に特異的な循環抗体のレベルが低い場合、HMGB1に特異的な全抗体の定量が好ましいであろう。

## 【0032】

定量がHMGB1に特異的な全抗体に基づく場合、本発明の方法は、HMGB1特異的抗体で形成された免疫複合体の解離に適したステップも含み、例えば、本発明の方法は、上記で開示され実施例で説明されるように、酸処理に基づいた定量方法を使用する、または含む。

## 【0033】

特定の一実施形態では、HMGB1に特異的な抗体の前記定量は、(対象から得られた)生体試料をHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質またはその誘導体と接触させることで実施される。試料と前記抗体との接触は、形成された複合体の定量と同様、インビトロで実行される。

## 【0034】

本発明はまた、HIVの感染が認められる対象から得た生体試料中のHIVウイルス負荷を監視するための方法であって、本明細書で述べたHMGB1に特異的な全抗体の定量方法、またはHMGB1に特異的な抗体に基づいた監視方法を実行する段階を含み、HMGB1に特異的な抗体が増加するほどウイルス負荷が減少する、方法に関する。

## 【0035】

「ウイルス負荷」は、HIV RNA(ウイルス粒子由来で、血漿内に存在する)、または、HIV DNA(細胞ゲノムに組み込まれ、細胞内に存在する)のいずれかを意味する。特定の一実施形態では、HMGB1に特異的な抗体の定量に基づいた本発明の方法はHIV RNAウイルス負荷の監視に適切である。

## 【0036】

本発明の定量方法、HIV感染、ウイルス負荷、または治療の効果を監視する方法、およ

10

20

30

40

50

び予後診断方法に対して、完全長HMGB1タンパク質(哺乳類由来、好ましくはヒト由来)の配列、またはHMGB1由来のあらゆるペプチド(10~30のアミノ酸残基)、またはポリペプチド(30~215のアミノ酸残基、好ましくは30~50、または30~100、または30~150残基)(HMGB1タンパク質誘導体)を、これら誘導体がHMGB1に特異的な抗体に結合する限り、および/または抗HGB1抗体の定量を可能にする限り、使用できることが理解される。このような誘導体は、組換えHMGB1(例えばHMG biotech、HM-115)、HMGB1の免疫反応性部分、様々な起源のHMGB1タンパク質に共通の配列を有するHMGB1の免疫反応性部分から成る群において選択される。このような例には、HMGB1のヒトおよびマウスに共通の配列に対応するHMGB1からの組換えBoxB(HMGbiotech HM-051)がある。

【0037】

これらの方法はHIVに感染した対象から得た、血液、血漿、血清、唾液、または他の体液もしくは組織等の生体試料で実行される。

【0038】

「HIV感染を監視する」は、HIV感染の進行の比較、つまり以前の分析と比較した安定性の低下、増加を意味する。HIV感染の進行は、HIV複製および/または標的細胞のゲノムへのHIVゲノムの組み込みを反映する。

【0039】

本発明はまた、HIVに感染した対象におけるHIV感染症の治療の効果を監視するためのインビトロの方法であって、本明細書で述べたHMGB1に特異的な全抗体の定量方法、またはHMGB1に特異的な抗体に基づいた監視方法を、治療中の異なる時点において前記対象から得た試料に対して実行する段階と、対象に施した治療の効果を測定する段階とを含む。

【0040】

本発明の方法において、HIV感染者におけるHMGB1に特異的な抗体の量を、非感染(つまり、HIVに感染していない)患者におけるHMGB1に特異的な抗体の量と比較してもよい。

【0041】

さらに、HMGB1に特異的な抗体の量を、同じ対象から異なる時点で得た量と比較してもよい。異なる時点とは、感染前、一次、急性、もしくは慢性感染中、または治療の開始前、例えば治療前と治療中の各月などである。

【0042】

物質を投与して、HMGB1に特異的な全抗体の量が、治療前の同一患者におけるHMGB1に特異的な全抗体の量と比較して減少した場合に、好ましくはM6(治療の開始から6カ月後)で少なくとも1/1.5、または、M12で少なくとも1/2~1/3に減少した、いずれかの場合に、本発明に記載の「治療」がなされる。用語「治療」はより一般的には、HIV感染、すなわちHIV RNAおよび/またはHIV DNAを減少させるために使用する任意の方法を指す。本発明に記載の「治療」は、抗レトロウイルス薬を使用する従来の治療を含包し、抗レトロウイルス薬には、ヌクレオシド/ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤(NRTI)、非核酸系逆転写酵素阻害薬(NNRTI)、プロテアーゼインヒビター(PI)、癒合または侵入阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、またはそれらの併用等がある。

【0043】

本発明は、HIVに感染した患者における、後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行状態またはAIDSへの進行状態のいずれかのインビトロの予後診断方法であって、上記開示の定量方法またはHIV感染を監視するための方法を、感染後に、好ましくは一次感染もしくは急性感染中または慢性感染中に患者から得た試料に対して実行する段階を含み、HMGB1に特異的な抗体レベルが高くなるほどAIDSまたは進行状態のAIDSが発症するリスクが高まる、方法も対象とする。

【0044】

用語「予後診断の」は、患者から得た試料からHMGB1に特異的な全抗体の定量が実施されるときに、その患者がAIDSを発症する、またはAIDSに進行するリスクを評価する確率を指す。表現「進行状態」は、AIDSの進行またはAIDSへの進行における様々な病期を指し、特に、世界保健機構によって作成され更新されるHIV感染と疾患に関するWHO病期分類シス

10

20

30

40

50

テムを参照して、以下に要約する。第1期は、HIV疾患は無症状で、AIDSとして分類されない。第2期は、わずかな粘膜皮膚の症状と、再発性上気道感染が見られ、第3期は、一カ月を越える原因不明の慢性下痢症、重度の細菌感染症および肺結核症を発症し、第4期は、脳のトキソプラズマ症、食道、気管、気管支または肺のカンジダ症、およびカポジ肉腫を発症する。

【0045】

HMGB1に特異的な抗体の定量に関する上記に開示したインビトロの方法はどれも、ELISA、または固体担体上にコートしたHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質もしくはその誘導体を使用する他の免疫学的検出方法の実施により実行されてもよく、任意選択で、HMGB1特異的な抗体を検出するための二次抗体を使用してもよい。

10

【0046】

以下に示す結果に基づき、本発明者らは、HMGB1がHIV-1感染患者においてインビボでHIV複製を引き起こすことを見出した。したがって、本発明の別の態様はまた、HIVに感染した対象の血清等の生体試料におけるHMGB1濃度増加の検出を含む。ウイルス負荷とHMGB1濃度との間の正相関も、HIV感染の監視に使用し得る。HMGB1レベルの増加は、疾患進行と関連する可能性、または予後の悪化に関連する可能性がある。生体試料におけるHMGB1濃度を、ELISAテスト等によく知られた診断テストで定量化してもよい。組換えhHMGB1、抗hHMGB1 mAb、およびウサギ抗hHMGB1血清は市販されており、このような診断テストにおいて使用され得る。このようなテストは、患者の試料におけるHMGB1濃度の定量化、HIV感染の進行の予後マーカーとしてのHMGB1の同定、およびヒト化抗HMGB1抗体のインビボでの影響の監視に使用される。

20

【0047】

本発明はまた、HIVに感染した対象におけるHIV感染を監視するためのインビトロの方法であって、前記対象から得た生体試料に含まれるHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質を、特に、HIVに感染した前記対象の生体試料をHigh mobility group box 1(HMGB1)に免疫的に結合する抗体と接触させることにより定量する段階を含み、定量の標的となるHMGB1タンパク質は、全HMGB1タンパク質、またはその循環分画(循環HMGB1)、またはその免疫複合体画分のいずれかである、方法に関する。

【0048】

本明細書に開示された、HIV感染、ウイルス負荷、または治療の効果を監視する方法、および予後診断方法は、循環(残存)HMGB1の定量、全HMGB1の定量、または、HMGB1/特異的な抗体の免疫複合体の画分の定量のいずれかに基づいて実行され得る。

30

【0049】

特定の一実施形態では、これらすべての方法は、循環HMGB1または全HMGB1の定量のいずれかに基づく。循環HMGB1のレベルが低い場合、全HMGB1の定量が好ましいであろう。定量が全HMGB1に基づく場合、本発明の方法は、HMGB1特異的な抗体で形成された免疫複合体の解離に適したステップも含み、例えば、本発明の方法は、試料の酸処理を使用する、または含む。

【0050】

適切な酸処理は、HMGB1タンパク質と特異的な抗体による認識能力とを変化させずに、特異的な抗体からHMGB1タンパク質を分離するために選択された、低pH、好ましくはpH1~3を有する酸性解離溶液と試料を接触させる段階を含む。特定の実施形態では、酸性解離溶液は、低pH、好ましくはpH1~3(例えば1.85)のグリシン(例えば1.5M)である。その後、酸処理を中和緩衝剤(トリス等、例えば1.5Mトリス、pH9)により停止する。別の好ましい実施形態において上記の1つと併用して、または併用せずに、酸性解離溶液中でのインキュベーションを20~37の温度で、好ましくは25で実行し、かつ/または中和ステップを氷中で行う。

40

【0051】

HMGB1タンパク質の定量を、HIVに感染していない対象から得た生体試料のHMGB1の量と、または異なる時点で同一患者から得た生体試料のHMGB1の量と比較してもよい。

50

## 【0052】

本発明はまた、HIVの感染が認められる対象から得た生体試料中のHIVウイルス負荷を監視する方法であって、HMGB1タンパク質の定量を実行する段階を含み、HMGB1タンパク質が増加するほどウイルス負荷が増加する、方法に関する。「ウイルス負荷」はHIV RNA(ウイルス粒子由来で、血漿内に存在する)、または、HIV DNA(細胞ゲノムに組み込まれ、細胞内に存在する)のいずれかを意味する。特定の一実施形態では、HMGB1の定量に基づいた本発明の方法はHIV RNAウイルス負荷の監視に適切である。

## 【0053】

本発明はまた、HIVに感染した対象におけるHIV感染症の治療の効果を監視するためのインビトロの方法であって、上記で開示されたHMGB1タンパク質に基づいたHIV感染を監視する方法を、治療中の異なる時点において前記対象から得た試料に対して実行する段階と、対象に施した治療の効果を測定する段階と、任意選択で、治療開始前の同一患者の試料で得られた結果と比較する段階とを含む方法に関する。物質を投与して、細胞内のHMGB1タンパク質の量が、治療前の同一患者におけるHMGB1の量と比較して減少した場合に、好ましくはM1(治療の開始から1カ月後)で少なくとも1/1.5、またはM3で少なくとも1/2に減少した、または、健常ドナーの試料において得られた値(500pg/ml未満)に到達したいずれかの場合に、本発明に記載の「治療」がなされる。HMGB1タンパク質の全量が健常ドナーの試料において得られた値に到達した場合に、治療は効率的であると見なし得る。用語「治療」はより一般的には、HIV感染、すなわちHIV RNAおよび/またはHIV DNAを減少させるために使用する任意の方法を指す。

## 【0054】

本発明はまた、HIVに感染した患者における、後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行状態またはAIDSへの進行状態のいずれかのインビトロの予後診断方法であって、感染後に、好ましくは一次感染もしくは急性感染中または慢性感染中に患者から得た試料におけるHMGB1を、上記で開示した任意の方法で定量する段階を含み、全HMGB1のレベルが高くなるほどAIDSまたは進行状態のAIDSを発症するリスクが高まる、方法に関する。HMGB1タンパク質に特異的な抗体に基づいた予後診断方法に関する上記の定義は、ここでも適用される。

## 【0055】

本発明の別の態様は、試料においてHigh mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に特異的な全抗体を定量するためのキットであって、a)上記で定義した、天然HMGB1タンパク質またはその誘導体、およびb)上記で定義した、患者から採取した場合に試料中に存在するHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるのに適した酸性解離溶液を含むキットに関する。

## 【0056】

本発明はまた、試料において全High mobility group box 1タンパク質(HMGB1)を定量するキットであって、a)上記で定義した、HMGB1タンパク質に特異的な抗体、またはHMGB1タンパク質に結合できるそのフラグメント、およびb)上記で定義した、患者からした場合に試料中に存在するHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるのに適した酸性解離溶液を含むキットに関する。これらのキットは、任意選択で、例えば上記で定義した、中和緩衝剤、および/またはHMGB1/特異的な抗体複合体に結合し、かつ/もしくはその構造を明らかにする二次抗体を含んでもよい。

## 【0057】

したがって、本発明のさらなる別の態様は、免疫不全状態ウイルス(HIV)感染の鑑別診断を含む診断、または対象のHIV感染のリスク評価に関する。この診断方法は、HIVに感染していると考えられる対象から得た、血液、血漿、血清、唾液、または他の体液等の生体試料とHigh mobility group box 1タンパク質(HMGB1)に免疫的に結合する抗体との接触、および、前記試料におけるHMGB1とHMGB1に結合する抗体または抗体フラグメントとの間で形成された複合体の検出を含む。試料と前記抗体との接触も形成された複合体の検出と同様、インビトロで行う。診断またはHIV感染リスクの指標を、HIV非感染の対照患者における、またはHIV-1感染等のHIV感染前の前記対象における抗体-HMGB1複合体と比較した場合

の、複合体形成の増加に基づいて決定してもよい。そのような診断方法の1つの例としては、ELISAの使用があり、ELISAでは、固体担体上にコートしたモノクローナル抗体、およびコートしたmAbに結合するHMGB1を検出するポリクローナル抗体を使用してHMGB1タンパク質を検出する。

【0058】

前記対象における急性および/または慢性炎症を排除するか制御するための、または検査対象におけるHIV存在または力価を表すための他の診断テストは、ヒト対象またはヒト以外の対象の全体的な診断過程の一部としても実行されてもよい。

【0059】

同様に、HIVの感染が認められる、または以前にHIVに感染していた対象を、対象の生体試料とHigh mobility group box 1(HMGB1)タンパク質に結合する抗体または抗体フラグメントとを接触させ、前記試料のHMGB1と前記抗体で形成された複合体を定量することにより監視してもよい。前記抗体と試料との接触は、形成された複合体の定量化と同様、インビトロで行う。ここで、複合体の量は、前記対象におけるHIV複製のNK依存型誘発の程度を示し、したがってHIV感染の重症度または進行の尺度となる。複合体形成を、HIVに感染していない対象から得た生体試料の複合体形成の量と、または同一対象から異なる時点で、例えば感染前、または一次、急性、もしくは慢性感染中に得た複合体形成の量と比較してもよい。この方法はまた、対象において、HIV感染に関連しないHMGB1に起因する急性および/または慢性炎症を排除するか制御するための他の診断テストを含んでもよく、対象におけるHIVウイルス負荷の存在に対する他の診断テストを伴ってもよい。

【0060】

本発明に記載の診断検査を実施する前に、HMGB1を、HMGB1に結合している他のタンパク質から分離するために、血清または血漿等の生体試料を酸で処理してもよい。酸処理を含むHMGB1タンパク質を検出および測定するための高感度な方法を教示している、特に参照により組み込まれるGaillardら、PLOS One 3(8) e2855, pages 1-9 (2008)を参照されたい。このような処理により、抗体が認識に利用するHMGB1抗原決定基の数が増加する。HMGB1のある抗体は、他のタンパク質の結合によりブロックされていないタンパク質の領域に結合するので、酸処理は任意選択である。

【0061】

診断適用に使用される抗体は、HMGB1の活性をブロックする必要がなく、HMGB1に結合するポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、または抗体フラグメントであってもよい。そのような抗体は既知の方法によってマウス、ラットおよびウサギ等の動物から得てもよく、当技術分野において知られた他の方法により産生してもよい。HMGB1レベルの診断、または監視に使用する抗体または他のHMGB1結合剤を、分析実施方法に関する紙媒体、または電子媒体の指示書、緩衝剤、保存剤、陰性および/または陽性対照試料、固体担体、および容器または包装材料を含むキットに組み込んでもよい。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】aNK細胞は、一次未成熟HIV-1感染DCの成熟を誘導する。(a)精製CD14<sup>+</sup>単球から生成したiDCを、IL-4とGM-CSFの存在下でaNK細胞と様々な比で24時間同時培養した。DCの生存を7-AAD分析を用いてフローサイトメトリーで測定した。生存DCは7AAD<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>細胞として同定した。データは3つの独立した実験を表し、値は平均±sdである。(b)aNK細胞は、iDCの成熟を誘導する。R5-HIV-1 BaL(p24、1ng/ml)に3時間感染させた、または非感染のiDCのいずれかを、rNK細胞またはaNK細胞と1:5の比でインキュベートしたiDCのフローサイトメトリー分析。HLA-DRおよびCD86特異的抗体で同時染色し、成熟DC(CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>)を同定した。3つの独立した実験のうちの代表的な実験のデータを示す。(c)この研究において使用された感染の状況は、iDCの増殖性感染の状況であり、これは、3日目で感染iDCの培養液上清においてp24が顕著に検出されたこと、およびCD40発現の標的となるDC内のp24のフローサイトメトリーによる細胞内検出により示される。実験は3つの別個のドナーのDCで行われ、値は平均±sdである。(d)HIV-1感染は、iDCの成熟をそれ自体では誘

10

20

30

40

50

導せず、これは0.001~10ng/mlのp24 HIV-1に感染したiDCのCD86/HLA-DRによる二重染色によって示される。LPS(DC0)(78.1%のCD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>)によって誘導されたmDCの割合を陽性対照として示す。(e)感染させた、または非感染のiDCの、rNKまたはaNK細胞のいずれかとの示される同時培養において誘導された成熟CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>DCの割合を示す。これらの実験を、数ドナーから得た一次細胞上で行い、そのうちの3つから代表的なデータを示す。印がある箇所は、統計分析をノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で行った。<sup>\*</sup>p<0.05、<sup>\*\*</sup>p=0.02

【図2】aNK-DCクロストークは、aNK細胞およびDCの両方でHMGB1発現を引き起こす。(a)サイトカイン含量を調査するため、iDC、rNK細胞、aNK細胞(10<sup>6</sup>/ml)の24時間無細胞培養液の上清、またはaNK細胞およびiDC(比1:5)の同時培養物を検査した。MAP技術を使用して、IL-1、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-12、およびIFN- $\gamma$ を定量し、HMGB1はELISAで定量した。<sup>\*</sup>p<0.05(ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法)(b)新規に選別した血液のNK細胞におけるHMGB1発現を免疫蛍光(赤)で検出した。DAPI(青)の対比染色により、HMGB1が核に局在していることが示された。(c)aNK細胞をHIV-1と一緒にインキュベートすると、HMGB1の分泌が阻害された。左のパネルは、aNK細胞(10<sup>6</sup>細胞/ml)を培地で、またはR5-HIV-1 BaL(p24、1ng/ml)で3時間インキュベートし、21時間後にHMGB1の産生を検査した結果を示す。データは3つの独立した実験を表し、値は平均 $\pm$ sdである。右パネルは、同じ調製のaNK細胞におけるHMGB1発現の免疫蛍光分析である。(d)aNK-iDCクロストーク中のHMGB1産生は、iDCのHIV-1感染によって阻害されない。iDCを培地中で、またはHIV-1 BaL(p24、1ng/ml)で3時間インキュベートし、さらにaNK細胞と21時間同時培養した(aNK:iDC比1:5)。その後、培養液上清におけるHMGB1濃度を測定した。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(e)非感染またはHIV-1感染iDCにおけるHMGB1発現の共焦点免疫蛍光分析を示す。上パネルは、非感染iDCを、中パネルは、細胞内のp24染色によって示したHIV-1感染および複製iDCを、下パネルは、HIV-1と一緒にインキュベートしたが、細胞内のp24発現では陰性であったiDCを示す。(f)成熟DCを、LPS(DC0)、可溶性CD40L(DC1)、またはLPS+PGE2(DC2)でiDCを48時間刺激して生成した。DC0、DC1、およびDC2を培地で3時間インキュベートするか、R5-HIV-1 BaL(p24、1ng/ml)に感染させ、さらに培地で21時間インキュベートした。培養液上清におけるHMGB1を定量した。3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを示す。(g)24時間同時培養した、aNK細胞と、非感染DC(上パネル)またはHIV-1感染DC(下パネル)のコンジュゲートにおけるHMGB1発現の免疫蛍光分析を示す。DCはDC-SIGN<sup>+</sup>であり、aNK細胞とDCは両方とも、これらのコンジュゲートにおいてHMGB1を発現する。異なった一次細胞調製物で実施した3つのうち代表的な1つ実験の画像を示す。

【図3】HIV-1に感染したiDCのaNK依存型成熟はHMGB1により仲介され、RAGEが関与している。(a)左パネルは、iDCを、遮断抗HMGB1抗体(10 $\mu$ g/ml)またはグリチルリジン(10 $\mu$ g/ml)の存在下、単独でまたはaNK細胞と一緒に24時間培養した。CD86およびHLA-DR特異的抗体でフローサイトメトリーを行い、DCの成熟状態を測定した結果を示す。右パネルは、同じ実験をHIV-1感染iDCで実施した結果を示す。データは、少なくとも3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表し、ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で統計的に比較した。<sup>\*</sup>p<0.05。(b)iDC(10<sup>6</sup>細胞/ml)をrh-HMGB1の濃度を増加させながら(1~10 $\mu$ g/ml)、48時間培養した。その後、細胞を抗CD86抗体、抗HLA-DR抗体、抗CD80抗体、抗CD83抗体、抗DC-LAMP抗体、および抗CD40抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。(c)DCによるサイトカインおよびケモカイン産生(MAPにより測定)に対するrh-HMGB1の影響。iDC(10<sup>6</sup>細胞/ml)を培地で、またはrh-HMGB1(1または10 $\mu$ g/ml)の存在下で48時間インキュベートした。陽性対照として、iDCをLPSで刺激した(DC0)。(d)iDC、DC0、またはrh-HMGB1(1 $\mu$ g/ml)と一緒にインキュベートしたiDCによるRAGEの表面発現のフローサイトメトリー検出。iDCは非感染、またはHIV-1に感染(p24、1ng/mlで3時間)のいずれかであった。(e)iDC、DC0、aNK細胞と24時間同時培養した非感染またはHIV-1感染iDCをrh-HMGB1(1 $\mu$ g/ml)と一緒にインキュベートし、続いて、抗RAGE抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。NK細胞を、CD3またはCD56特異的抗体(CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)で同時染色することによって分析から排除した。

10

20

30

40

50

【図4】HIV-1に感染したDCによってNK誘発Th1分極が障害されるが、これはIL-12とIL-18の産生の変化と関係している。(a)NK細胞が誘発するDCによるTh1分極を、rNKまたはaNK細胞( $2 \times 10^5$ /ml)の存在下で30分間iDC( $10^6$ /ml)をインキュベートすることで検査した。ナイーブCD4 T細胞( $10^6$ /ml)を同時培養に付加し、IFN- またはIL-4を産生するT細胞の頻度を8日後にフローサイトメトリーで決定した。実験は、非感染iDC(b)またはHIV-1感染iDC(c)、またはAZT(1mM)存在下のHIV-1感染iDC(d)のいずれかでいった。示した培養物の培養液上清におけるIL-12(e)、IL-18(f)、およびIFN- (g)の含量を検査した。データは、5つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で統計的に比較した。 $^*p<0.05$ 、 $^{**}p=0.03$ 。

【図5】NKDCクロストークの結果としてのDCにおけるHIV複製のHMGB1依存型誘発を示し、(a)単独で、またはrNKもしくはaNK細胞( $2 \times 10^5$ /ml)の存在下で3日間インキュベーションを行った後、HIV-1感染(下パネル)iDCまたは非感染(上パネル)iDC(CD40<sup>+</sup>)( $10^6$ /ml)におけるp24細胞内発現のフローサイトメトリー分析。(b)同じ培養物の培養液上清におけるp24濃度。3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdである。 $^*p<0.05$ ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法(c)単独で、またはaNK細胞存在下で3日間培養したHIV-1感染iDCにおける細胞内p24発現の免疫蛍光分析。核をDAPIで染色する。(d)単独で、またはaNK細胞存在下で6日間培養したHIV-1感染DC0( $10^6$ /ml)における細胞内p24発現のフローサイトメトリー。(f及びg)単独で、またはrNKもしくはaNK細胞存在下で6日間培養したHIV-1感染成熟DCの培養液上清におけるp24濃度。3つの独立した実験の平均 $\pm$ sd。統計は、ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で比較した。 $^*p<0.05$ 。(e)先に示した培養物由来の細胞でのライトサイクル分析によって決定したHIV-1プロウイルスDNAレベル。異なった一次細胞調製で実施した3つの実験うちの代表的な1つを示す。

【図6】外来性のrh-HMGB1は、iDCにおいてHIV-1およびHIV-2複製を引き起こす。(a)HIV-1感染iDCを単独でまたはaNK細胞存在下で3日間培養した。Rh-HMGB1( $1 \mu\text{g/ml}$ )をいくつかの培養物に付加した。HIV複製を、培養液上清におけるp24を定量することで測定した。(b)HIV-1感染iDCを単独でまたはaNK細胞存在下で3日間培養した。遮断抗HMGB1抗体( $10 \mu\text{g/ml}$ )またはグリチルリジン( $10 \mu\text{g/ml}$ )を培養開始時に付加した。HIV複製を、培養液上清におけるp24を定量することで測定した。3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを示す。統計は、ノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で比較した。 $^*p<0.05$ (c)HIV-2感染iDCを単独でまたはaNK細胞存在下で3日間培養した。Rh-HMGB1( $1 \mu\text{g/ml}$ )をいくつかの培養物に付加した。HIV複製を、培養液上清におけるp24を定量することで測定した。

【図7】活性化NK細胞(aNK)は、NK:DC比が5:1の場合、未成熟の樹状細胞(iDC)のアポトーシスを急速に誘導する。(a)健常ドナーの精製CD14<sup>+</sup>単球から生成したiDCを、IL-4とGM-CSFの存在下で、2つの異なったNK:DC比で(1:5および5:1)、静止NK細胞(rNK)またはaNK細胞と24時間同時培養した。DCの生存を7-AAD分析を用いてフローサイトメトリーで測定した。NK細胞を、CD56<sup>-</sup>集団をゲートして分析から排除した。生存DCは7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>high</sup>細胞である。データは、3つの独立した実験を表す。(b)aNK細胞によって誘導されたiDCのアポトーシスのライブビデオ映像顕微鏡法。異なった一次細胞調製で実施した3つの実験のうちの代表的な1つの画像を示す。(c)同時培養物における生存DCの割合によって評価されたaNK細胞によるiDC殺作用の動態。これらの実験は数名の健常ドナーからの一次細胞で行い、3つの実験から代表的なデータを示す。

【図8】aNK細胞による殺作用に耐性のあるDCは成熟した表現型を示す。(a)精製CD14<sup>+</sup>単球から生成したiDCを、IL-4とGM-CSFの存在下でaNK細胞とNK:DC比5:1で24時間同時培養した。DCの生存を7-AAD分析を用いてフローサイトメトリーで測定した。NK細胞を、CD56<sup>-</sup>集団をゲートして分析から排除した。生存DCは7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>high</sup>細胞である。アポトーシスに加えて、aNK細胞はiDCの成熟を誘導する。HLA-DRおよびCD86特異的抗体で同時染色し、成熟DC(CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>)を同定した。陽性対照として、iDCをLPSで48時間刺激して成熟DCを生成した(DC0)。3つの独立した実験の代表的な実験のデータを示す。(b)単独で、またはaNK細胞とNK:DC比5:1で同時培養したiDCを、抗CD83抗体および抗DC-SIGN抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。両マーカーの陽性発現は、iDCの成熟し

10

20

30

40

50

た表現型を示す。データは、3つの独立した実験のうち1つを表す。

【図9】iDCのaNK依存型のアポトーシスはTNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)依存型であり、DR4受容体が関与している。(a)CD56<sup>+</sup>NK細胞を健常ドナーの血液から精製したNK細胞を、インターロイキン2(IL-2)(100ng/ml)の最適濃度以下の培養物に維持し(rNK細胞)、または培養物にPHA(10 $\mu$ g/ml)およびIL-2(10 $\mu$ g/ml)を付加して、活性化した(aNK細胞)。抗CD56抗体による染色強度により、CD56を高度に発現する(CD56<sup>bright</sup>細胞)、および弱く発現する(CD56<sup>dim</sup>細胞)2つのNK細胞集団を見分けることができる。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(b)NK細胞による膜TRAIL(mTRAIL)発現を、抗CD56特異的抗体および抗mTRAIL特異的抗体によるフローサイトメトリーで測定する。データは、3つの独立した実験のうち1つを表す。(c)抗CD56抗体および抗mTRAIL抗体でaNK細胞を同時染色した。CD56<sup>bright</sup>およびCD56<sup>dim</sup>集団におけるmTRAILを発現するaNK細胞の割合を測定した。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(d)フローサイトメトリーによるiDC表面のTRAIL受容体DR4発現の検出。ある場合には、iDCをaNK細胞とNK:DC比5:1で同時培養した。NK-DC同時培養開始から1、2、3.5、6、および24時間後にDC表面でのDR4発現を分析する。これらの実験を3つのドナーで実施し、それらのうちの1つの代表的なデータを示す。(e)iDC(10<sup>6</sup>細胞/ml)を、組換えヒト可溶性TRAIL(rhs-TRAIL)の濃度を増加させながら(1~1000ng/ml)で24時間培養した。その後、7-AAD分析で細胞死を定量した。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(f)可溶性TRAIL(sTRAIL)含量を調査するため、iDC、rNK細胞、aNK細胞(10<sup>6</sup>/ml)の24時間無細胞培養液の上清、またはaNK細胞およびiDC(比5:1)の同時培養物を検査した。sTRAILはELISAで定量した。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(g)iDCを、遮断抗DR4抗体(250ng/ml)の存在下、または非存在下、単独で、またはaNK細胞で(NK:DC比5:1)24時間培養した。DCの生存状態を7-AAD分析を用いてフローサイトメトリーで測定した。データは、3つの独立した実験のうち1つを表す。

【図10】TRAIL分泌はHIV-1存在下でも持続されるが、R5-HIV感染DCは、aNK細胞による殺作用に耐性を示す。(a)iDCはR5-HIV-1 B<sub>al</sub>(p24、1ng/ml)に24時間感染させたか、または非感染のどちらかであり、数回の洗浄後に、aNK細胞と一緒に1:5および5:1の比でインキュベートした。iDC生存度を7-AADテストを用いてフローサイトメトリーで評価した。生細胞は7-AAA<sup>-</sup>、アポトーシス細胞7-AAD<sup>+</sup>、およびアポトーシスの壊死組織片は7-AAD<sup>-</sup>FSC<sup>low</sup>である。ドットプロットは、少なくとも3つの独立した実験のうち1つを表す。(b)R5-HIVはiDC成熟を誘導しない。DCは、非感染(iDC)、p24、1ng/mlでR5-HIV-1感染させた(HIV-DC)、またはLPSで48時間刺激した。その後、細胞をCD86とHLA-DRで染色した。データは、少なくとも3つの独立した実験のうち1つを表す。(c)iDCのHIV感染はTRAIL分泌に影響しない。iDC、HIV感染DC(10<sup>6</sup>/ml)の24時間無細胞培養液上清、aNK細胞-iDC同時培養(比5:1)、およびaNK細胞-HIV感染DCの同時培養(比5:1)を、可溶性TRAIL(sTRAIL)の含量についてELISAで検査した。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを表す。(d)HIV-1感染DCは、TRAIL誘導アポトーシスに感受性なままである。iDCおよびHIV感染DC(10<sup>6</sup>細胞/ml)をrhs-TRAILの濃度を増加させながら(1~1000ng/ml)、24時間培養した。その後、7-AAD分析で細胞死を定量した。3つの独立した実験の平均 $\pm$ sdを示した。

【図11】High-mobility group box 1(HMGB1)は、NK誘導DCアポトーシスに対するHIV-1感染iDCの耐性に関連する。(a)iDCまたはHIV-1感染iDCを単独でまたはaNK細胞存在下(NK:DC比5:1)で培養した。ある実験では、アジドチミジン(AZT)をHIV感染時に付加し、他の実験では、グリチルリジン(10ng/ml)を同時培養開始時に付加した。その後、細胞死を7-AAD分析で定量した。(b)同じ実験を、遮断抗HMGB1抗体存在下(10および15 $\mu$ g/ml)で実施した。実施した3つの実験うち代表的な1つを示す。

【図12】(a)aNK細胞は、iDC表面のTRAIL受容体(DR4)発現をアップレギュレートすることで、非感染iDCのアポトーシスを誘導し、TRAIL依存型アポトーシスに対するDCの感受性を高める。(b)HIV-1感染DCはHMGB1依存メカニズムによりaNK誘導アポトーシスに耐性を示す。したがって、aNK細胞は、感染DCの持続、CD4 T細胞へのDC依存型HIV感染、およびHIV貯蔵の確立に関与する。

【図13-1】(A)抗HMGB1抗体のELISA分析のための条件の測定。HMGB1でコートしたウ

エルを飽和させるBSA濃度の測定を示す。

【図13-2】(B) 抗HMGB1抗体のELISA分析のための条件の測定。結合抗HMGB1抗体を明らかにする抗IgG-PAL抗体濃度(二次抗体)の測定を示す。(C) 抗HMGB1抗体のELISA分析のための条件の測定。ウェルをコートするためのHMGB1濃度の測定を示す。(D) 抗HMGB1抗体のELISA分析のための条件の測定。標準曲線の生成のための精製抗HMGB1抗体濃度の測定を示す。

【図13-3】(E) 抗HMGB1抗体のELISA分析のための条件の測定。分析の特異性を示す。

【図14】HMGB1タンパク質、またはBoxBでコートした抗HMGB1抗体価測定。

【図15】無処理か、グリシン1.5Mで処理したヒト血清を、抗HMGB1 IgG抗体に関して力価測定した。循環(フリー)抗HMGB1抗体をけば線で表し、複合抗HMGB1抗体を灰色で表した。

10

【図16】HIV<sup>+</sup>患者の血清中のHMGB1濃度の力価測定。各ヒストグラムはそれぞれ患者一人を表す。水平線は、ELISA検定によって検出された最小レベルを示し、破線は健常ドナーのHMGB1の平均レベルを示す。

【図17】HAART後、異なる時点(月単位)で測定された、T細胞部分集合(A)およびHIVウイルス負荷(B)へのHAARTの影響。\*\*\*:p<0.001および\*\* :p<0.05。

【図18】M0でHAARTを受けるHIV感染患者の血清中のHMGB1の力価測定。破線は、健常ドナーのHMGB1の平均の濃度を示す。

【図19】HIV感染患者の血清中の抗HMGB1抗体の力価測定、および抗レトロウイルス療法の影響。M-1は、治験参加の15~30日前に検査した患者の血清サンプルを表す。M1、M3、M6およびM12は、HAART後の異なる時点を示す。ENDは、M9とM12との間でHAARTを止めた患者を表す。

20

【図20】血清HMGB1および抗HMGB1抗体濃度の間(A)、ならびに、抗HMGB1抗体およびHIV-RNAウイルス負荷の間(B)の相関に関する研究。スピアマンの相関検定。相関係数r、相関確率(p)、および分析された標本数(n)を示す。

【0063】

(実施例)

HMGB1は、ほとんどすべての真核細胞にある核内タンパク質であり、ヌクレオソーム形成を安定化するために機能し、転写要素様のタンパク質として作用し、いくつかの遺伝子の発現を制御する。HMGB1は、また受傷、感染または他の炎症性の刺激に応じて活性化マクロファージ、成熟樹状細胞(DC)およびナチュラルキラー(NK)細胞によって分泌されるサイトカインでもある。

30

【0064】

ウイルス感染の初期段階では、先天免疫のエフェクター、すなわちNK細胞およびDCの局在動員および活性化を伴う。DCは、抗原提示、天然CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化、さらにTh1分極化にとって不可欠である。DCはまた、HIVの初期の標的であり、プロウイルスDNAを組み込むことによりHIV持続の一因となる。DCの成熟およびホメオスタシスはDCとNK細胞の間のクロストークによって制御される。このクロストークがHIV複製に対するDCの感受性に寄与することは、以前は知られていなかった。

【0065】

活性化NK細胞(aNK)は、NK細胞と未成熟DC(iDC)との接触の間に放出され、iDCsの成熟およびIL-12依存型のTヘルパー1細胞応答の誘導を促進するHMGB1のソースを提供する。iDCsがHIV-1に感染することで、DCはNK依存型IL-12分極化に非感受性となり、Th1応答を誘導できない。加えて、NK依存型のDC成熟および生存は、HIV-1 p24の産生増加、およびDCによるプロウイルスDNAの発現増加に関連していた。DCにおけるNK依存型のHIV-1複製増加は、HMGB1に特異的な抗体、およびHMGB1に特異的に相互作用することが知られているグリチルリジンにより阻害されたことから、この過程におけるこのサイトカインの重要な役割が示唆される。当然の結果として、rh-HMGB1が感染DCへの直接的な効果を有し、培養液上清におけるp24の産生を劇的に増加させた。DCでのHIV複製に対するHMGB1の強い刺激効果は、aNKとiDC同時培養においても認められた。HMGB1に特異的な中和抗体、またはグリチル

40

50

リジンを付加することで、単独で、またはaNK細胞の存在下で培養された感染DCによるHIV-1産生が抑制された。これらすべての結果より、HMGB1は、感染DCに組換えヒトタンパク質として付加したか、またはNK:DCクロストーク中にaNK細胞により産生されたかに関らず、感染DCにおけるHIV-1複製を引き起こし、HIV-DNAを増加させることが示される。

【0066】

DCの直接感染は、CD4<sup>+</sup>T細胞の感染より効率が悪いが<sup>40, 41</sup>、増えつつある数々の証拠から、DCによるウイルス産生に依存してDCが仲介する長期間のHIV感染が示され<sup>42, 43, 44</sup>、インビボでHIVに感染したDCは、リンパ系組織への遊走の間のウイルス貯蔵として機能し、ウイルス感染を広げている恐れがある。

【0067】

本発明者らは、活性化NK細胞が、HIV-1感染DCにおいてウイルス貯蔵を確立する一因となることを初めて示した。本発明者らは本明細書において、HIV-1感染iDCのNK細胞活性化能力、およびaNK-iDCクロストークで産生されたHMGB1が、DCでのHIV-1複製およびプロウイルスDNA発現の刺激作用に大きく関与していることを示した。NK細胞とのクロストークに伴い、成熟感染DCによるTh1分極誘導が強く障害されることも実証した。これらの観察により、効率的にHIVの伝播を促進し、宿主免疫系から免れる能力を阻害する新規の治療が導き出された。

【0068】

自己由来のiDCとNK細胞との相互作用はお互いを活性化するとともに、T細胞が生成される前の免疫応答の初期相の開始/増幅において重要であると思われる<sup>11</sup>。NK細胞は、iDCの成熟を引き起こすが、これはHMGB1依存型メカニズムを経由して生じる<sup>20</sup>。iDCのNK依存型成熟は、DCの機能的な分極に関与すると報告されており、細胞内のフリーCa<sup>2+</sup>濃度の上昇、細胞骨格系転位、NK/DCシナプスの分泌型ライソゾームの蓄積、および相互作用するNK細胞へのIL-18の調節された発現を伴う。これを受けて、NK細胞は大量のHMGB1を分泌し、DC成熟を誘導する<sup>20</sup>。発明者らは、NK-DC接触の間のNK依存型DC成熟におけるHMGB1の関与を実証したが、これは抗HMGB1抗体、またはHMGB1と特異的に相互作用することが知られるグリチルリジンの阻害効果によって示された<sup>31</sup>。共焦点顕微鏡法分析、および無細胞培養液上清におけるHMGB1検出により、既に報告されているように<sup>20</sup>、HMGB1は一次NK細胞によって発現され分泌されたが、それだけでなく単離されたDCによっても産生され、HMGB1放出のレベルはその成熟段階に関連していることが実証された。iDCがaNK細胞と接触した場合に、成熟DCによる放出量に匹敵する、高水準のHMGB1が検出された。興味深いことに、NK-DCコンジュゲートの共焦点顕微鏡法分析により、両細胞がサイトカインを発現したことが示された。DCがaNK細胞と相互作用した後、HMGB1受容体であるRAGEが急速に誘導され、さらにダウンレギュレートされることが見出されたが、これはNK依存型DC成熟にHMGB1が関連することと矛盾しない。HMGB1は、DC成熟の一因となることに加えて、iDC上で化学遊走物質として作用し<sup>45</sup>、RAGEにより活性が仲介される<sup>45, 46</sup>、CCR7およびCCR4リガンドに応答した成熟DCの遊走にも必要であることが示された<sup>46</sup>。このようにHMGB1は警告として働き、DCに対する活性化作用および化学走性作用を有し、炎症組織から流入領域リンパ節へのDCの遊走を刺激する<sup>45</sup>。HIVによって誘導されるような、制御不能なウイルス感染の文脈においては、このようなHMGB1の特性を考慮に入れなければならない。

【0069】

CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>DCの頻度が示すように、iDCのHIV-1増殖性感染はDCのNK依存表現型成熟を保存するが、HIVそれ自体は、使用したp24濃度範囲(0.001 ~ 10ng/ml)においてDC成熟を誘導しなかった。しかしながら、aNK-DC相互作用の結果、iDCにおけるHIV-1感染は著しく増加した。これは、いくつかの方法により示され、p24<sup>+</sup>DC頻度の増加を表す。NK-DC培養液上清におけるp24放出の著しい増加に関連しており、免疫蛍光により単一細胞レベルで確かめられた。さらに、NK-DCクロストークにより、DCにおけるプロウイルスHIV-1 DNA発現が劇的に増加した。DCとNK細胞の相互活性化におけるHMGB1の重大な役割を考慮し、遮断抗HMGB1抗体またはグリチルリジンがある場合に、iDCにおけるHIV-1複製の誘発へのHMGB1の寄与を評価した。これらの阻害物質がp24放出に与える強いブロック効果

10

20

30

40

50

により、HMGB1がこの過程に関与することが示される。両障害物質により、NK細胞の非存在下における感染iDCの24時間培養において、HIV-1複製も著しく減少したことは注目に値する。これはiDCによるHMGB1の自発的放出によるとみられ、本明細書で示されるとともに、以前にも報告されており<sup>46</sup>、この放出は、iDCのHIV-1感染後も保存された。これらの観察から、DCでのHIV-1複製の制御におけるHMGB1の中心的役割が明らかとなる。当然の結果として、rh-HMGB1により、感染DC、およびaNK-感染DC同時培養の培養液上清においてp24放出が著しく増加したことが実証された。血漿HMGB1レベルが、慢性HIV-1-感染患者において高く、臨床的合併症を有する患者において最も高濃度であることが見出されたことより、これらのデータはHIVの病因を理解する上で重要な意味合いを持つ可能性がある<sup>47</sup>。さらに、外来性のHMGB1は、インビトロで、抗レトロウイルス療法で治療中のHIV-1感染患者のPBMCにおいてHIV-1の再活性化を誘導すると報告された<sup>39</sup>。

#### 【0070】

分泌HMGB1は、同種のDCによる活性化後、ナイーブCD4 T細胞の増殖、生存、および分極に必要であり、これらの作用は、DCにより発現されたRAGEに関与している<sup>48</sup>。本明細書で、同質であるという条件において、HMGB1はそれ自体では、Th1分極を誘導できないことが示された。実際、HIV-1感染DCはHMGB1を正常レベルで産生し続けたが、IL-12とIL-18の放出が阻害され、HIV-1感染DCの存在下でのTh1応答は誘導されなかった。最近の研究では、Th1分極の調節におけるNK細胞の必要不可欠な役割が強調されており、NK細胞がDCによるIL-12とIL-18の放出を引き起こし、次いで、NK細胞によるIFN- $\gamma$ の産生が促進され、これにより、T細胞のTh1細胞への分化が引き起こされることが示唆されている<sup>49,50</sup>。NK細胞の活性化に応答してIL-12とIL-18を多く産生するHIV-1感染DCの障害は、Th1分極の障害に関連したため、Th1分化におけるIL-12およびIL-18の必要不可欠な役割が、本明細書で確認された。この障害は、DCにおけるHIV-1複製に直接関連しており、HIV阻害剤AZTの正の効果により示された。これらの観察から、HIV感染患者のDCにおいて報告されているいくつかの機能的な変化<sup>51,52</sup>、例えばIL-12を含む数種のサイトカインの分泌減少、および自己由来CD4 T細胞を刺激する能力の障害、がNK-DCクロストークの障害に関連する可能性があることが示唆される。近年同様のことが示唆されている<sup>30</sup>。

#### 【0071】

発明者らは、HIV-1複製の活性化、およびHIV-1感染DCにおけるウイルス貯蔵の確立は、aNK細胞と自己由来DCとの間のクロストークに依存していることを示し、このクロストーク中にNK細胞とDCの両方から産生されるHMGB1の、この過程における中心的役割を同定し、DCにおけるHIV複製のNK依存型誘発は、HMGB1に特異的に結合するグリチルリジン、または抗HMGB1抗体のプロッキングによって完全に抑制されることを示した。加えて、NK細胞とのクロストーク後、HIV-1感染DCがTh1分極を誘導する能力が著しく障害されることも実証した。ウイルス伝播の促進におけるNK-DCクロストークの役割、およびウイルス複製の誘発およびウイルス貯蔵への補充におけるHMGB1のインビボでの関与に基づいて、HIV感染を治療し、監視する方法を記述する。

#### 【0072】

##### (実施例1)

活性化NK細胞は、HIV-1に感染した自己由来の一次未成熟樹状細胞の成熟を引き起こす。

単離された単球から単球由来DCを生成し、同一ドナーから精製されたNK細胞と同時培養することで、DC成熟におけるNK細胞の役割を調べた。NK細胞は休止している(rNK)か、またはPHAおよびIL-2の併用により活性化(aNK)させた。aNK細胞を自己由来の未成熟DC(iDC)と24時間同時培養すると、NK/DC比に依存して、iDCの生存またはアポトーシスのいずれかが誘導されたが、これは、先の報告<sup>14</sup>と一致している。実際には、aNK/DC比が5:1である場合、DCのアポトーシスを引き起こし、1:5の場合、DCの生存を引き起こした(図1a)。aNK/DC比が1:5である場合のiDC生存は、成熟DCの特徴である成熟マーカーCD86およびHLA-DRの共発現の増加が示すように(CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>DCの基準は15.3%であるが、aNK細胞により、72.1%となった)(図1b)、DCの成熟に関連している。CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>DCの割合によって判断されるように、同じ実験条件下でrNK細胞がDCの成熟に与える影響は

小さかった(図1b、e)。iDCの増殖性感染の条件下で、iDCのHIV-1感染後3日目に、iDCの培養液上清におけるp24放出の測定と、iDC細胞内のp24染色を行ったが(図1c)、iDCのNK依存型の成熟には変化がなかった(図1b)。

#### 【0073】

DC成熟におけるHIVの直接の効果は、HIV濃度が0.001~10ng/mlの範囲で見られたが、DC成熟の強力な誘発物質として正の対照として使用されたLPSとは対照的に、HIVは成熟マーカーCD86およびHLA-DRの発現を増加させなかった(図1b、d)。図1eに示す、代表的な3ドナーのデータから、iDCが感染しているかどうかにかかわらず、aNK細胞との24時間の同時培養後にaNK細胞がiDCの成熟に大きな影響を与えることが確認された。これらのデータは、増殖性HIV1に感染したiDCが、NK-DCクロストーク中にNK細胞により誘導された成熟に対して、通常感受性を維持することを示す。

#### 【0074】

##### (実施例2)

aNK-DCクロストークは、NK細胞とDCの両方でHMGB1発現を引き起こす。

iDCのaNK依存型成熟に関与する分子を同定するために、multianalyte profiling(MAP)を使用して、iDC、NK細胞、およびaNK:iDCの24時間培養で産生された重要なサイトカインをマップした。iDCはIL-1、IL-6、およびIL-12を少量放出し、IL-10またはTNF- $\alpha$ を産生しなかった。aNK細胞とiDCを同時培養すると、炎症性サイトカインプロファイルが誘導され、IL-12分泌が大きく増加し、NK細胞由来のTNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ が有意水準となり、IL-10は産生されなかった(図2a)。興味深いことに、これら培養液上清においてHMGB1が高度に検出され、HMGB1はiDCとNK細胞の両方に由来しているが、aNK:iDC同時培養により培養液上清におけるHMGB1濃度は大きく増加した(図2a)。共焦点顕微鏡法により単一細胞レベルで、NK細胞がHMGB1を産生する能力があり、HMGB1は、新たに単離したNK細胞の核において検出され(図2b)、さらに、aNK細胞の原形質に移動した(図2c)ことが確認された。HIV-1と一緒に3時間インキュベーションを行うと、aNK細胞におけるHMGB1発現が大きく減少した。これは培養液上清、および共焦点顕微鏡法で検出された(図2c)。HMGB1レベルはrNK細胞でのレベルと比較可能なレベルに到達した(図2a)。本発明者らは、NK細胞がHIV-1を複製できないことを確認した。これは、培養液上清でp24が検出されなかったこと、およびNK細胞で細胞内p24染色(FACSによる検出)がなかったことにより示された(データは示さない)。HMGB1はiDCによっても分泌され、iDCが感染しても、培養液上清には比較可能な量のサイトカインが産生された(図2d)。HIV-1に感染しているかどうかにかかわらず、HMGB1のほとんどは、iDCの原形質で検出され(図2e)、p24とHMGB1の二重細胞内染色が示すように、感染DCのp24発現はHMGB1の発現を変更しなかった(図2e)。iDCをaNK細胞と同時培養した場合、培養液上清でHMGB1の分泌が強く誘導されることが確認され(図2d)、その量は成熟DC、すなわちDC0、DC1、およびDC2が産生するレベルと比較可能なレベルに達した(図2f)。iDCのHIV-1感染は、NK-DC同時培養(図2d)、および成熟DCの培養(図2f)で産生されたHMGB1の量に大きな影響は与えなかった。共焦点顕微鏡法分析により、aNK細胞とiDCのコンジュゲートの形成が示されたが、この複合物は、aNK細胞をHIV-1感染DCと同時培養した場合にも観察された。また、DCの感染状態にかかわらず、両細胞はHMGB1を発現した(図2g)。これらの結果により、NK細胞とiDCの両方がNK-DCクロストーク中にHMGB1を発現し、この工程はiDCのHIV-1感染により変更されないことが実証された。

#### 【0075】

##### (実施例3)

HIV-1感染iDCのaNK依存型成熟はHMGB1により仲介され、RAGEが関与している。

NK依存型DC成熟にHMGB1が関与している可能性を確認するために、溶解性のHMGB1分子<sup>31</sup>と特異的に相互作用することが知られているグリチルリジン抗HMGB1抗体と同様に使用した(図3a)。24時間のaNK-iDC同時培養開始時に付加したこれら阻害物質により、成熟DC(CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>として同定)の割合が、aNK細胞がない場合に観察される基準レベルにまで減少した(図3a)。同様の効果は、感染DCでも得られた(図3a)。iDCを1~10 $\mu$ g/mlのrh-HMGB1で24時間処理したが、rh-HMGB1それ自体では、iDCの表現型成熟を誘導せず、

10

20

30

40

50

類似のデータは48時間の培養でも得られた(図3b)。実際、iDCの自然成熟は、CD86<sup>bright</sup>HLA-DR<sup>bright</sup>DCの高い割合が示すように、培地での48時間培養後に観察されたが、10 µg/mlのrh-HMGB1では、これら細胞の割合は、65%から71%までわずかに増加しただけであった。興味深いことに、CD80とCD83の発現が不足していること、およびmDC(DC0)において完全に発現されるDC-1ampの発現が弱いこと(図3b)により評価されるようにrh-HMGB1処理DCは完全には成熟していなかった。しかしながら、rh-HMGB1処理DCによるケモカイン、MCP1、MIP-1、MIP-1、およびIL-8の放出が増加したことが示すように、これら部分的成熟DCは、rh-HMGB1に機能的に感受性であった(図3c)。HMGB1受容体には、RAGE<sup>32,33</sup>、TLR-2、およびTLR-4<sup>34</sup>がある。RAGEはHMGB1の最初に同定された受容体であり、T細胞、単球、マクロファージ、およびDC<sup>35</sup>などの種々の免疫細胞により発現され、成熟DCがインビボでリンパ節へホーミングする際に使用される<sup>36</sup>。iDCではTLR-2とTLR-4はほとんど検出されないが(図示せず)、フローサイトメトリーにより示されるように、RAGEはDCで完全に発現し、成熟DC0ではより高度に発現していた(図3d)。HMGB1 1 µg/mlでiDCをインキュベートすると、RAGEのダウンレギュレーションが観察され、これらの細胞がこの受容体を使用したことが強く示唆される(図3d)。DCがHIV-1に感染しても、iDCとDC0でRAGEレベルは変化しなかった。感染DCをHMGB1とインキュベーションすると、類似のRAGEのダウンレギュレーションが誘導された(図3d)。NK-DCクロストークにおけるRAGEの関与の可能性を、同じ方法で、aNK細胞と同時培養したDCおよび単独で培養したDCでのRAGE発現を比較して評価した。aNK細胞との同時培養を2時間行った後、DCでRAGE発現のアップレギュレーションが見られ、24時間後にダウンレギュレーションした(図3e)。HIV-1感染DCでもたいへんよく似た観察がなされた(図3e)。このように、HMGB1は、NK-DCクロストークの間、非感染およびHIV-1感染iDCの成熟に重要な要素であり、またRAGEが関与しており、iDCでのRAGEの発現は増殖性感染後も変わらない。

【 0 0 7 6 】

(実施例4)

NK-DCクロストークの障害の結果としてのHIV感染DCによるTh1分極の障害。

NK細胞とiDCとの相互作用の結果、1型分極化DCが誘導されるが、これはTh1応答誘導のNK細胞由来支援のキャリアとして働く<sup>37</sup>。aNK細胞とのクロストーク後に、Th1応答を分極する感染または非感染DCの能力を評価するため、ナイーブCD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>T細胞を、DCおよびaNK細胞の存在下で8日間同時培養した。Th1分極をT細胞におけるIFN- $\gamma$ とIL-4の細胞内産生を検出することで決定し、FACSによって測定した(図4a)。ナイーブT細胞とiDCとの同時培養ではIFN- $\gamma$ 陽性T細胞の割合は増加せず、ナイーブT細胞をiDCとrNK細胞で同時培養した場合にも同様のデータが得られた。対照的に、ナイーブT細胞をaNK細胞存在下でiDCと同時培養すると、IFN- $\gamma$  T細胞応答の著しい増加が誘導され(図4b)、これは、aNK:iDCクロストークがTh1分極にとって不可欠であることを示唆している。HIV-1感染DCで同じ実験を行ったが、Th1分極は観察されなかった(図4c)。HIV-1複製がTh1分極の障害に寄与することがAZTの付加により示されたが、これはaNK細胞と一緒に同時培養された感染DCによって誘導されるIFN- $\gamma$  T細胞応答の増加をAZTが回復させたのである(図4d)。AZTは、これらの条件においてウイルス複製を阻害する濃度で使用したが、この濃度は上清にp24抗原を投与して評価した(データは示さない)。IL-12とIL-18はDCにより産生される重要なサイトカインで、Th1分極に関与している。このことにより、DCによるこれらのサイトカインの放出に対するaNK-DCクロストークの影響の問題に取り組んだ。aNK-DCクロストークが、非感染DCによるIL-12およびIL-18の両方の分泌を引き起こすことが見出された。両サイトカインの産生が、aNK細胞および感染DCの同時培養において、もはや検出されなかったことは重要である(図4e、f)。加えて、HIV-1感染DCで同時培養を行った場合、aNK-DCクロストーク中のNK細胞によるIFN- $\gamma$ 産生の誘発は、もはや検出されなかった(図4g)。Th1分極のためのDCの初回刺激が、DCにより放出されたIL-12およびIL-18、ならびにNK細胞により放出されたIFN- $\gamma$ 等のサイトカインの誘導によりaNK-iDCクロストーク中に起こる。HIV-1感染すると、NK-DCクロストークの障害により、iDCはaNK細胞によりもはや分極化されない。したがって、HIV-1感染DCのTh1分極を誘導する能力が低下する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 7 】

## (実施例5)

iDCにおけるHIV-1の複製および持続のNK-DC依存型誘発におけるHMGB1の中心的役割

NK感作HIV-1感染DCによるTh1分極の障害がHIV-1複製に依存する(図4d)ことが示されたので、本発明者らはaNK-iDC相互作用が、iDCにおけるHIV-1複製を引き起こすかどうか検査した。iDCはHIV-1(p24、1ng/ml)に3時間感染させ、単独でまたはrNKならびにaNK存在下で18時間さらに培養し、p24が細胞内で発現しているDCの頻度をフローサイトメトリーで測定した。感染したiDCを単独で培養した場合、p24<sup>+</sup>DCの割合は極めて低いが、aNK細胞と相互作用すると、p24<sup>+</sup>DCが全DCの約三分の一を占め、NK細胞の非存在下ではたった4%であった(図5a)ことと比較すると、著しく増加した。同じ条件下で、rNK細胞はiDCのHIV複製に影響を与えなかった(図5a)。感染DCにおいてaNKに依存して増加したHIV複製は、培養液上清でのp24抗原検出によって確認され、単独でまたはrNK細胞と一緒に培養した感染iDCと比較して、aNKのHIV-1iDCとの同時培養では、p24産生の統計的に有意な増加が検出された(図5b)。NK-DC相互作用がp24発現DCの頻度に与える劇的な効果はp24特異的抗体を用いて共焦点顕微鏡法によって確かめられた。感染翌日に細胞内のp24が染色されたDCは極めて稀であったが、DCをaNK細胞で培養すると、p24<sup>+</sup>DCが高度に観察された(図5c)。興味深いことに、iDCのHIV複製に対するaNK細胞の正の影響は成熟DCでも同様に観察された。FACSで検出されるp24<sup>+</sup>DCの頻度が、aNK細胞で24時間同時培養されたHIV-1感染DC0においてDC0単独培養と比較して(図5d)増加したことが見出された。aNK細胞と同時培養されたHIV-1感染成熟DC0、DC1、およびDC2の培養液上清におけるp24検出により、成熟DCのHIV-1複製におけるaNK細胞の著しい刺激効果が確認された(図5f及びg)。rNK細胞は成熟感染DCにおけるHIV-1複製に著しい影響を及ぼさなかったことは注目すべきである(図5f及びg)。本発明者らは、aNK細胞がiDCにおけるプロウイルスDNA発現に影響を与えるかどうか検査した。図5(e)のデータは、HIV-1プロウイルスDNA複製物の数が、rNK細胞との、または単独での感染iDC培養と比較して、感染iDCのaNK細胞との培養で大きく増加したことを示す。

10

20

30

## 【 0 0 7 8 】

最近、外来性のHMGB1は、感染単球細胞系でのHIV-1複製を増加させ<sup>38</sup>、またインビトロで、抗レトロウイルス療法で治療中のHIV-1感染患者のPBMCでHIV-1の再活性化を誘導すると報告された<sup>39</sup>。したがって、DCにおけるHIV複製のNK依存型誘発におけるHMGB1の役割に関する問題に取り組んだ。外来性のrh-HMGB1がHIV-1感染iDCへの直接的な影響を有し、培養液上清におけるp24の産生を劇的に増加させることが見出された(図6a)。rh-HMGB1はまた、aNK細胞と同時培養したHIV-1感染iDCによるp24産生に著しい刺激効果を有していた(図6a)。HMGB1が感染iDC-aNK同時培養でのHIV-1複製誘発に与える影響を調べるため、HMGB1に特異的な中和抗体またはグリチルリジンはこの同時培養に付加し、上清のp24産生を測定した。両HMGB1阻害物質は、aNK細胞と同時培養した、または単独で培養した感染iDCによるHIV-1産生を抑制した(図6b)。これらの結果より、外来性のHMGB1が感染iDCによるHIV-1複製を引き起こすことが示された。また、iDCにおけるHIV-1複製に対するaNK細胞依存型の刺激作用がHMGB1により仲介されることも示された。

40

## 【 0 0 7 9 】

## (実施例6)

一次細胞の単離および分離。

末梢血単核球(PBMC)を、フィコールハイパック密度勾配法で健常ドナー(EFS Cabanel, Paris, France)の血液から分離した。CD14<sup>+</sup>単球を、CD14に特異的な免疫磁気ビーズ(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)を使用して、正の選択によってPBMCから単離した。iDCを生成するために、記載にあるように<sup>53</sup>、精製CD14<sup>+</sup>単球を、グルタミン2mM、10%FCS、ペニシリン(100U/ml)、およびストレプトマイシン(100 μg/ml)を添加したRPMI1640培地で、組換えヒト(rhu)GM-CSFおよび10ng/mlのrhIL-4(Peprotech INC, Rockyhill, USA)の存在下で6日間培養した(1X10<sup>6</sup>細胞/ml)。2日毎に培養液を交換した。NK細胞を、CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD123、CD66b、グリコフォリンA(StemCell Technologies)に対する抗体の枯渇混合液を使用して、単球を欠いたPBMCから負の選択で単離した。フローサイトメト

50

リー (FACScalibur, Becton Dickinson) で FITC コンジュゲート抗 CD3 抗体および APC コンジュゲート抗 CD56 抗体を用いて CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 細胞として測定された NK 細胞に富む画分は、異なる実験において 85 から 95% まで変動した。FITC コンジュゲート抗 CD14 抗体で評価された骨髄細胞によるコンタミネーションは、一貫して 1% 未満だった。ナイーブ CD4 T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) を、CD4 と CD45RA に特異的な免疫磁気ビーズ (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) を使用して、PBMC から正の選択で単離した。単離されたナイーブ CD4 T 細胞の細胞純度は 90% を常に超えていた。

【 0 0 8 0 】

(実施例 7)

NK 細胞の活性化および感染

精製 NK 細胞を、細胞を生存したまま維持 (rNK として参照) するため、IL-2 (100 ng/ml) (Pe protech) の最適濃度以下で  $10^6$  細胞/ml で培養したか、または、PHA (10  $\mu$ g/ml) (Sigma) および IL-2 (10  $\mu$ g/ml) の併用により活性化 (aNK 細胞として参照) した。いくつかの実験では、a NK 細胞 ( $10^6$  細胞/ml) を HIV-1 (p24 1 ng/ml) の存在下で、3 時間インキュベートし、さらに 21 時間培養した。この条件下では、増殖性感染は観察できなかった。その後、サイトカインおよびケモカイン検出のために培養液上清を検査した (以下参照)。

【 0 0 8 1 】

(実施例 8)

樹状細胞の成熟および表現型の分析

IL-4 と GM-CSF の存在下で 6 日間の培養後に、iDC ( $10^6$  細胞/ml) を刺激せず、または DC0 細胞を得るため LPS (大腸菌 (E. coli) セロタイプ 026-B6, Sigma-Aldrich) 10  $\mu$ g/ml で、DC1 細胞を得るため三量体の CD40L (Sigma-Aldrich) 500 ng/ml で、もしくは DC2 細胞を得るため LPS 10  $\mu$ g/ml および PGE2 (Sigma-Aldrich) 1  $\mu$ g/ml で、48 時間刺激した。DC の表現型の分析およびそれらの成熟段階の特性評価をフローサイトメトリーで行った。DC を、PBS/10%、FCS/0.1%、NaN<sup>3</sup> の 100  $\mu$ l で希釈した、CD80、CD83、CD86、HLA-DR、CD40、DC-LAMP、または DC-SIGN (抗体はすべて BD Biosciences, San Jose, CA) に特異的な抗体を使用して、4 で 20 分染色した。いくつかの実験では、DC を染色するために HMGB1 受容体、RAGE (Abcam) に特異的な抗体を使用した。2 回の洗浄後、細胞を PFA 1% で固定し、直後に FACScalibur (Becton Dickinson) で収集し、Flow Jo ソフトウェアで分析した。

【 0 0 8 2 】

(実施例 9)

樹状細胞の HIV-1 感染

ウイルス株調製を、健常ドナーの MDM で R5-HIV-1 Ba-L を増幅して調製した。その後、ウイルス株を、HIV-1 p24 濃度の測定前に遠心分離により、先浄した。iDC を 200,000 細胞/ウェルで 96 ウェル培養プレートに播種し、様々な濃度 (p24/ml 0.001 ~ 10 ng) の R5-HIV-1 BAL で 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 37 で 3 時間インキュベートした。細胞を回収し、10% FCS を含む培地で 4 回洗浄し、必要な場合は、別に示さない限り、rNK または aNK 細胞を NK/DC 比 1:5 で付加した。NK-DC 同時培養を、DC の成熟段階の分析および/またはウイルス産生の定量化の前に 24 時間続けた。ある実験では (図 6)、HIV-1 感染 iDC を、rh-HMGB1 (1  $\mu$ g/ml) (R&D Systems) 存在下で、およびある培養においては、ウサギ抗 HMGB1 抗体 (10  $\mu$ g/ml) (Abcam, Cambridge, UK) またはグリチルリジン (10  $\mu$ g/ml) の存在下で、単独、または aNK 細胞と 3 日間インキュベートした。

【 0 0 8 3 】

(実施例 10)

HIV-1 ウイルス産生、プロウイルス負荷、および感染 DC の頻度の定量化

感染細胞培養物の上清における HIV-1 の濃度を、ELISA (Ingen, Belgium) で p24 タンパク質の量を測定することにより、測定した。これまでの記載にあったように<sup>54</sup>、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Basel, Switzerland) を使用して、細胞から DNA を抽出し、RT-PCR 法によって HIV-1 プロウイルス負荷を定量した。HIV-1 感染細胞の頻度を、細胞内の p24 分子を検出するフローサイトメトリーで測定した。細胞表面を、DC を標的とする CD40 特異

10

20

30

40

50

的抗体(BD Biosciences、San Jose、CA)で染色し、細胞内はp24特異的抗体(Coulter)で染色した。染色した細胞をPFA1%で固定し、直後にFACScalibur(Becton Dickinson)で収集し、Flow Joソフトウェアで分析した。ある実験では、感染DCをレーザー走査型共焦点顕微鏡法によって、免疫蛍光後に画像化した。

【 0 0 8 4 】

(実施例11)

iDCとNK細胞の同時培養

別に示さない限り、rNKまたはaNKをiDCまたはmDCと1:5( $2 \times 10^5$  NK+ $10 \times 10^5$  DC/1ml)の比で24時間同時培養した。これまでの記載にあったように<sup>55</sup>、7-AAD分析でDCの生存を測定した。簡単に述べると、培養細胞を細胞核色素7-アミノアクチノマイシンD(7-AAD、St. Quent in-Fallavier、Sigma-Aldrich)20  $\mu$ g/mlを使用し、4 で30分間染色し、CD56特異的抗体(BD Biosciences、San Jose、CA)で同時染色した。生存DCをCD56<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>細胞として同定した。NK-DC同時培養においてDCの表現型特性評価を行った際には、NK細胞をFACS分析からCD56特異的抗体による染色で常に排除した。

【 0 0 8 5 】

(実施例12)

サイトカインおよびケモカイン産生の測定

無細胞培養液上清を、iDCを $10^6$ 細胞/ml、rNKまたはaNK細胞を $2 \times 10^5$ 細胞/ml、またはaNKとiDC細胞を1:5の比で、24時間インキュベートして調製した。ケモカインとサイトカインを、Luminex(24plexキット、Biosource)で製造者の指示にしたがって測定した。簡単に述べると、標準物質の上澄50  $\mu$ lを抗体結合ビーズで2時間インキュベートし、洗浄液で2回洗浄し、ビオチン化二次抗体で1時間インキュベートした。streptavidin-PEを使用した最後のインキュベーションを30分間行い、Luminex100ISで収集した。各分析物で少なくとも100のイベントが収集された。標準曲線を上回る、または下回る値は、測定された最低、または最高の濃度と置換した。無細胞培養液上清のHMGB1の定量化をELISAキット(IGT、Hamburg)で行った。NK誘発DCによるナイーブCD4 T細胞のTh1分極を検査する実験において(図4)、培養液上清におけるIL-12、IFN- $\gamma$ 、およびIL-18の定量化をELISAキット(R&D SystemsのIL-12およびIFN- $\gamma$ 、MBLのIL-18キット)で行った。

【 0 0 8 6 】

(実施例13)

Th1分極分析

これまでに報告されているように<sup>56</sup>、ナイーブCD4T細胞( $10^6$ /ml)を、非感染またはHIV-1感染iDC( $10^6$ /ml)および静止または活性化NK細胞( $2 \times 10^5$ /ml)の存在下で8日間同時培養し、Th1分極をフローサイトメトリーで検査した。簡単に述べると、タンパク質分泌を阻害するために培養の最後の16時間に、brefeldine A(10  $\mu$ g/ml)(Sigma Aldrich)を付加した。PerCPコンジュゲートCD8抗体およびFITCコンジュゲートCD3抗体(BD Biosciences、San Jose、CA)、で表面染色を行い、続いて、1%PFA、4 で15分間細胞固定を行い、サポニン緩衝剤(PBS-BSA0.2%-NaN<sup>3</sup>0.01%-サポニン0.5%)で透過処理を行い、APCコンジュゲートIFN- $\gamma$ またはIL-4特異的抗体(BD Biosciences、San Jose、CA)で細胞内染色を行った。染色細胞を、直後にFACScalibur(Becton Dickinson)で収集し、Flow Joソフトウェアで分析した。Th1分極に対するHIV-1複製の影響を分析するため、単独でまたはHIV-1感染iDC+/-rNKまたはaNK細胞存在下でインキュベートしたナイーブCD4 T細胞の培養開始時にAZT1mMを付加した。AZTは同時培養の最後まで残った。上述したようにiDCのHIV-1感染を、AZT非存在下で行った。

【 0 0 8 7 】

(実施例14)

統計分析

統計分析をノンパラメトリックなマン-ホイットニー検定法で行った。有意差のP値が報告された。プロットしたデータは平均 $\pm$ 標準偏差を表す(s.d.)。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

## (実施例15)

HIV-1感染樹状細胞はHMGB1依存メカニズムによりNK誘導アポトーシスに耐性である。

樹状細胞(DC)およびナチュラルキラー(NK)細胞は、感染に対する初期防御において決定的役割を担う重要な先天性エフェクターである。NK-DCクロストークは最近実証された。このクロストークは双方向性であり、両細胞型の活性化状態に依存して、NK細胞の活性化およびキラー細胞への分化、DCの成熟またはアポトーシスを導く可能性がある。DCはヘルパーCD4<sup>+</sup>T細胞のTh1エフェクターへのプライミングに必要であり、HIV等の制御不能なウイルスの慢性型の発現により、DCの成熟障害および破壊が誘導される恐れがある。この研究で、我々は、DC破壊へのNK-DC相互作用の影響、およびこのクロストークに対するHIVの影響の問題に取り組んだ。

10

## 【0089】

未成熟DC(iDC)を、健常ドナーから選別した単球から調節し、IL-4とGM-CSFの存在下で6日間培養した。いくつかの実験では、iDCをR5-HIV-1(p24 1ng/ml)に感染させた。自己由来の精製aNK細胞(PHA+IL-2によって活性化)との同時培養実験は、様々なNK/DC比で実施された。DCの成熟およびアポトーシスに対するNK-DC相互作用の影響を、多変量フローサイトメトリーを使用して、7-AAD染色を、HLA-DR、DC-SIGN、CD83、CD86、DR4、mTRAILなどに特異的なモノクローナル抗体による膜および細胞内染色と組み合わせて、分析した。

## 【0090】

aNK細胞は、NK/DC比が5:1で非感染iDCのアポトーシスを急速に(1~2時間以内)誘導することが見出された。NK-DC同時培養のライブビデオ顕微鏡法によって、NK-DC接触直後に、DCは典型的なアポトーシス表現型(細胞の容積および泡の増加)を示す(図7)。生存DCは、成熟細胞の表現型を示す(図8)。iDCアポトーシスには、aNK細胞により産生されたTNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)が関与しており、膜レベルでTRAILを発現するCD56<sup>bright</sup> NK細胞と、TRAIL受容体DR4を発現するDCの間の相互作用が仲介している。NK依存型のiDCアポトーシスは、抗DR4抗体の中和により完全に抑制され、ここから、この過程におけるTRAIL依存型経路の重要な役割が強調される(図9)。しかしながら、NK-DC同時培養へのコンカナマイシンA(顆粒球依存細胞毒性の阻害剤)を付加しても、DCアポトーシスにおけるパーフォリン経路の関連を除けば、NK依存型のDCアポトーシスに対する効果はない。

20

## 【0091】

aNK誘導iDCアポトーシスに対するHIVの影響を調べるために、iDCをR5-HIV-1(p24/ml 1ng)に感染させた。HIV感染後、iDCはaNK依存型アポトーシスに耐性となった。感染iDCをCD86/HLA-DRで同時染色して示したように、HIV-1は、iDCの成熟をそれ自体では誘導しない(図10)。aNK細胞によるTRAIL分泌は、iDCのHIV感染には影響されず、HIV-1感染DCはTRAIL誘導アポトーシスに感受性を有したままであった(図10)。グリチルリジンまたは遮断抗HMGB1抗体存在下での阻害分析により示したように、aNK誘導アポトーシスに対するHIV-1感染iDCの耐性は、HMGB1に依存することが見出された(図11)。iDC感染時にアジドチミジン(AZT)を付加することで実証したように、aNK誘導アポトーシスに対するHIV-1感染iDCの耐性は、DCにおけるHIV-1複製に依存することが見出された(図11)。まとめると、これらの結果より、iDCがHIV-1に感染することで、炎症性サイトカインHMGB1が関与するaNK誘導アポトーシスに対する感染iDCの耐性が誘導されることを示す。

30

40

## 【0092】

本発明者らは以前から、aNK細胞とHIV-1感染iDCとの間のクロストークによって、DCにおけるウイルス複製およびプロウイルスDNA発現が劇的に増加し、この過程は、主としてHMGB1に引き起こされていることを認識していた。実施例における結果により、HIV-1感染DCの生存における重要な介在物質としてのHMGB1の決定的な関与を示され、ここからウイルスの持続およびHIV貯蔵の確立におけるHMGB1の役割が強調される。これらの結果から、ウイルス伝播を効率的に促進するためにHIVがどのようにDCを「ハイジャックするか」、また、HIV感染症治療のためにこの特質をどのように使用できるかが示される。

## 【0093】

## (実施例16)

50

## HIV-2存在下でのaNK-DC同時培養実験

ウイルス複製のNK依存型誘発に対するHIV-2感染DCの感受性の問題に、HIV-1の場合と同様に取り組んだ。この過程におけるHMGB1の影響を評価した。

1 DCのHIV-2感染:iDCを96ウェル培養プレートに500,000細胞/ウェルで播種し、HIV-2(p24/ml 20ng)と5%CO<sub>2</sub>雰囲気下37℃で3時間インキュベートした。

2 NK-DC同時培養:細胞を回収し、10%FCSを含むRPMIで3回洗浄し、必要な場合は、aNK細胞をaNK/DC比1:5で付加した。必要な場合は、組換えHMGB1を10 µg/ml (R&D Systems)、またはウサギ抗HMGB1抗体(1 µg/ml) (Abcam、Cambridge、UK)を付加した。NK-DC同時培養を、培養液上清におけるウイルス産生の定量化前に3~7日続けた。

3 HIV-2ウイルス産生の定量化:上清のHIV-2粒子の濃度を、p24ELISAキット(Ingen、Belgium)で測定した。

【0094】

図6Cで示すように、感染DCを単独で培養したか、またはaNK細胞存在下で培養したかに関らず、感染の3日後、HIV-2産生はかなりの低レベルで検出された。rh-HMGB1により、ウイルス複製はわずかに増加した。我々のHIV-1に関する以前の研究で観察されたように、DCの感染後3日では、有意なウイルス複製を検出するには早すぎる。これらの同時培養上清は7日後に再度検査する。

【0095】

(実施例17)

ヒト血清におけるHMGB1タンパク質および抗HMGB1抗体の検出/HIVに感染した患者における疾患活性との関連

HIV感染者の血清におけるHMGB1タンパク質の濃度は、シノテストのELISAキット(ABL)によって定量した。

【0096】

さらに、全抗HMGB1特異的抗体を検出するため、特定のELISA分析を開発した。HMGB1に特異的な自己抗体がSLE(全身性紅斑性狼瘡)で発見できる(Hayashi et al., 2009)ことを考慮し、HIV感染者において抗HMGB1抗体を検出されたかどうか、およびそれらのレベルがHIV感染と関連していたかどうかを確かめた。

【0097】

抗HMGB1抗体検出のためのELISA分析

以下の2ステップの分析を開発した。

(1)第一ステップでは、ヒトHMGB1に特異的なウサギポリクローナル抗体を使用し、コートしたHMGB1またはBoxBでの抗体の力価測定のための条件を定義した。抗HMGB1抗体は、血清(Urbonaviciute et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. J Leukoc Biol. 2007 81:67-74)において、免疫複合体として発見されると考えられたため、抗体の力価測定前にこれらの複合体を解離させる方法を開発した。

(2)第二ステップでは、ドナー数グループから得たヒト試料(健常ドナー、敗血症性ショック患者、または抗レトロウイルス療法前後のHIV<sup>+</sup>患者のいずれかの血清)を使用した。

【0098】

下記の試薬を使用した。

-ヒトHMGB1(Adcam ab18256)に対するウサギ一次ポリクローナル抗体はヒトHMGB1のC末端150残基由来のKLHコンジュゲート合成ペプチドに対して作用する。

-ヒトHMGB1と99%同一のラットHMGB1をコードする発現プラスミドから大腸菌で産生された組換えHMGB1(HMGBiotech HM-115)。

-ヒトとネズミにおいて全く同一の哺乳類の配列をコードする発現プラスミドから大腸菌で産生されたHMGB1(HMGBiotech HM-051)からの組換えのBoxB。

-対照ウサギ血清(Sigma、参照番号R9133)。

-フォスファターゼアルカリ(PAL)とコンジュゲートした抗ウサギIgGまたはIgM、基質P-ニトロフェニルリン酸錠(pNPP)。

-キャリブレーター:血清(Sigma、参照番号12511)のヒトIgG、および血清(Sigma、参照番

10

20

30

40

50

号18260)のヒトIgM。

-ヤギにおいて産生された、抗ヒトIgG(Fc特異的)アルカリフォスファターゼ抗体(Sigma、参照番号A9544)、ヤギにおいて産生された抗ヒトIgM( $\mu$ 鎖特異的)アルカリフォスファターゼ抗体(Sigma、参照番号A3437)。

【0099】

下記の分析を実施した。

【0100】

96ウェルプレートのコーティングをDPBS中3  $\mu$ g/mlのHMGB1をまたは0.5  $\mu$ g/mlのBoxBのいずれかで4 で一晩行った。同時に、キャリブレーションのコーティングを、イソタイプ対応のDPBSにおいて系列希釈で行った(ヒト試料で実行されたELISA分析に対してのみ)。マイクロプレートウォッシャー(Antis, Oasys)を使用して、DPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)20でプレートを4回洗浄した。同様の洗浄をELISA分析の各ステップ後に行った。非結合サイトをPBS/2%(w/v)BSAで4 で2時間ブロックした。DPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)/1%(W/V)BSAで希釈した血清サンプルの100  $\mu$ lアリコートコートした、およびコートしていないウェルに付加し、37 で1時間インキュベートした。すべての血清試料は、処理しないで、または、グリシン1.5M(v/v、pH1.85)で、ウォーターバスで25 で30分間処理し、さらに氷上で維持し、1.5Mトリス、v/v、pH9.0で希釈して検査した。その後、試料を直ちに希釈し(1/10~1/1000)、コートしたプレートに入れた。DPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)/1%(W/V)BSAにおいて希釈した、抗ウサギIgGアルカリフォスファターゼコンジュゲート抗体(希釈率1/10000)、またはヤギ抗ヒトIgG(希釈率1/2000)、もしくはIgM(希釈率1/2000)アルカリフォスファターゼコンジュゲート抗体を37 で1時間付加した。抗原特異的抗体の検出を、100  $\mu$ l pNPP基質で、37 で30分インキュベーションした後に行った。NaOH3Mを100  $\mu$ l付加して反応を止めた。我々が以前に、ShigellaLPS(Launay et al. Vaccine 2009, 27:1184~1191)に特異的なELISAで報告したように、HMGB1またはBoxB特異的抗体の濃度を、Ascent softwareのThermoElectrocorpによって標準免疫グロブリン溶液の吸光度から得られた標準曲線により算定した。データを検出された抗体の $\mu$ g/mlで表す。

【0101】

この分析を進めるために、いくつかのパラメータを、HMGB1またはBoxBでコートしたプレートのいずれかを使用して検査し、ウサギ抗ヒト抗体の力価を測定した。得られた結果は下記のとおりである。

-BSA濃度が2%~5%である場合、等しく効率的である(図13A)。

-抗IgG-PAL抗体の1/10000希釈液を、精製抗HMGB1抗体の力価曲線の直線部分にあるため選択した(図13B)。矢印により示す。

-精製抗HMGB1抗体の力価曲線の直線性によって示されるように、HMGB1濃度2.5~5  $\mu$ g/mlがウェルをコートするために最適であった(図13C)。

-精製抗HMGB1抗体濃度0.5  $\mu$ g/mlを選択した(図13D)。

-ウサギ抗HMGB1抗体と比較して、免疫していないウサギ抗体の反応がないことから、この検定は特異的であり(図13E)、

-HMGB1またはBoxBのいずれかでコートしたプレートで精製ウサギ抗ヒト抗体を検査した時に比較可能なデータを得た。さらにBoxB(HMGB1の主要な免疫原性の一部)を選択した(図14)。

【0102】

ヒト試料における複合体抗HMGB1抗体の検出のための酸処理

ヒト生体試料の検査に必要な分析条件を測定するため、一連のヒト血清を、HMGB1特異的抗体の存在に関して力価測定した。[HMGB1/抗HMGB1抗体]複合体が生体試料の中にあつたと仮定して、これらの免疫複合体を解離させるためのグリシン1.5M、pH1.85での前処理の影響を分析した。すべての血清試料は、処理しないで、またはグリシン1.5M(v/v、pH1.85)を用いてウォーターバス中25 で30分間処理し、さらに氷上で維持し、1.5Mトリス、v/v、pH9.0で希釈して検査した。その後、試料を直ちに希釈し、コートしたプレートに入れ、上記のように検査した。

## 【 0 1 0 3 】

図15に示すデータから、グリシン1.5Mで処理して免疫複合体を解離させない限り、ヒト血清において抗HMGB1抗体はほとんど検出されないことが示される。したがって、ほとんどのHMGB1特異的抗体はHMGB1と複合体を形成し、炎症誘発性分子の中和メカニズムを示す。

## 【 0 1 0 4 】

HIV<sup>+</sup>患者の血清におけるHMGB1および抗HMGB1抗体の定量化

循環性HMGB1および抗HMGB1抗体を、未治療のHIV感染(HIV<sup>+</sup>)患者において、疾患の異なる病期で検査した。

## 【 0 1 0 5 】

1. HIV感染患者の血清におけるHMGB1力価測定

図16は、HIV<sup>+</sup>患者において、健常ドナー(破線)と比較して、HMGB1の循環レベルの増加が検出されることを示す。

## 【 0 1 0 6 】

2. CD4細胞、CD8細胞、プロウイルスDNA、およびHIV RNA VLに対する強力な抗レトロウイルス療法の影響

7人のHIV<sup>+</sup>患者(検出可能なウイルス負荷を有する、VL)の1年の臨床フォローアップの間に、抗HIV薬剤の併用で構成する高活性抗レトロウイルス剤療法(HAART)の免疫学的効果(宿主細胞へのHIV侵入および複製をブロックする)、HAARTの開始(M0)、およびHAARTの1(M1)、3(M3)、6(M6)、および12(M12)カ月後にCD4細胞、CD8細胞、プロウイルスDNAおよびHIV RNA VLを測定した。結果を下記の表、および図17に示す。

## 【 0 1 0 7 】

## 【表 1】

	患者						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
M0							
HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	6.72	4.15	3.54	5.65	4.90	6.15	3.85
M1							
△HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	3.72	2.37	1.50	3.51	2.09	2.35	1.46
M3							
△HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	3.25	2.85	1.94	3.40	2.32	2.10	2.24
M6							
△HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	4.82	2.85	1.40	3.96	2.30	0.81	2.24
M12							
△HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	4.84	2.85	2.24	2.88	3.30	2.21	2.55

## 【 0 1 0 8 】

患者の特性を示す表より、HAARTは、すべての患者において、HIV-RNA VLの顕著で急速な抑制を誘導し、(ウイルス負荷は、所与の時点でのVLと基準のM0におけるVLの間の差異を意味する)、検出不可能レベル(50複製/ml血液)に到達することが示される。さらに、HAARTは血中のCD4 T細胞の数の有意な増加を誘導する一方で、CD8 T細胞レベルでは変化は検出されなかった(図17A)。HAARTは、また原形質のHIV-RNAウイルス負荷の有意な減少を(M0に対してM1、M3においてp<0.001、M6およびM12においてp<0.05)誘導する。細胞関連HIV-DNAに対する有意な効果は観察されなかった(図17B)。

## 【 0 1 0 9 】

3. これら血清試料におけるHMGB1および抗HMGB1抗体に対する強力な抗レトロウイルス療法の影響。

HMGB1および抗HMGB1抗体の血漿濃度を、HAARTの開始(M0)、およびHAARTの1(M1)、3(M3)、6(M6)、および12(M12)か月後に力価測定した。抗体価を上で記述した分析によって測定した。つまり、力価測定の前にグリシンで患者の血清を処理し、抗HMGB1抗体を定量した。結果を図18および19に示す。

10

20

30

40

50

【0110】

これらの患者の血清試料におけるHMGB1の力価測定により、HAART存在下のHIV-RNA VLの抑制がHMGB1のレベルの減少に関連することが示された(図18)。M6で、HMGB1レベルは健常者のレベル(破線)に到達した。したがって、HAARTの影響により、HMGB1産生におけるHIVの駆動的な役割が論証される。

【0111】

図19におけるデータにより、抗HMGB1抗体の検出可能な濃度がM0における患者の血清において見出され、抗レトロウイルス療法は、M6において抗HMGB1濃度の低下を誘導し、M12で検出不可能な値に到達することが示された。基準と比較して抗HMGB1抗体レベルにおける統計的に有意な減少を、M6(p=0.05)および後の時点(M12)で同様に検出した。

10

【0112】

したがって、HMGB1および抗HMGB1レベルの合同測定により、慢性HIV感染は、HMGB1の産生を引き起こすこと、そしてこれが中和抗体の産生を引き起こすことが示される。これは、HMGB1レベルの急降下(M3)と抗HMGB1レベルの低下(M6)の間の遅れを意味する動的過程であり、強力な抗レトロウイルス療法の後に両分子レベルは正規化されている。

【0113】

抗HMGB1レベルとHIVウイルス負荷の間の相関

上述の結果を考慮して、HMGB1および抗HMGB1抗体の循環レベルがHIV-RNAウイルス負荷と関連するかどうかに関する重要な問題に取り組んだ。

【0114】

したがって、HIV+患者の血清試料を、ウイルス負荷を変動させながら、疾患の異なる病期で検査した。結果を、下記の表(スピアマンの相関検定)、および図20に要約する。

20

【0115】

【表2】

	HMGB 1	HIV-RNA VL
抗 HMGB1 抗体	r = -0.5 P = 0.018 n = 22	r = -0.49 p < 0.0001 n = 61

r=相関係数:p<0.05:>95% 2つの変数が相関する確立 n=調査した患者数

30

【0116】

図20Aに示すように、HMGB1および抗HMGB1抗体値の間に逆相関があり、低レベルのHMGB1が高水準の抗体に関連するように、HMGB1産生は、HMGB1を中和する抗HMGB1抗体の合成を誘導することを示している。

【0117】

図20Bでは、抗HMGB1抗体とVLの間の逆相関が示され、抗HMGB1抗体の中和活性により、抗体はウイルス複製に対するHMGB1の刺激活性を抑制することが示唆される。

【0118】

これらのデータから、HIV+患者における抗HMGB1に基づいた治療により、HMGB1中和、そしてウイルス負荷の減少につながり、この治療の有益な影響が主張される。

40

【0119】

改変形態および他の実施形態

本発明の概念と同様、開示された産物、組成物、および方法の様々な修飾形態および変更形態は、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、当業者に明らかになる。本発明を、特定の好ましい実施形態との関係で説明してきたが、特許請求に係る発明は、こうした特定の実施形態に限定することを意図しないことを理解されたい。本発明を実施するために記述された様態の、医薬、免疫学、生物、化学薬品もしくは薬品作用学、または関連分野の専門家に明らかな各種の変更は、以下の請求項によって包含されるものとする。

【0120】

50

### 参照による組み込み

本開示において引用、または参照される各文献、特許、特許申請、特許公開、特に、テキストにおける参照の引用を包含する特定の主題に関するものは、参照により完全に組み込まれる。このようないかなる参考文献も先行技術を構成することは自認されず、引用された文献の正確性および適切性に異議を申し立てる権利は留保される。

【 0 1 2 1 】

( 参考文献 )

### REFERENCES

1. Meng, G. et al. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 8, 150-6 (2002). 10
2. Pope, M. & Haase, A.T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9, 847-52 (2003).
3. Geijtenbeek, T.B. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-97 (2000).
4. Lee, B. et al. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 75, 12028-38 (2001). 20
5. Gurney, K.B. et al. Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DCSIGN+ cells in human rectal mucosa. *J Virol* 79, 5762-73 (2005).
6. Turville, S.G. et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3, 975-83 (2002).
7. McDonald, D. et al. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300, 1295-7 (2003).
8. Arrighi, J.F. et al. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 200, 1279-88 (2004). 30
9. Piguet, V. & Sattentau, Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114, 605-10 (2004).
10. Wu, L. & KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6, 859-68 (2006).
11. Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293, 253-6 (2001). 40
12. Carbone, E. et al. Recognition of autologous dendritic cells by human NK

cells. *Eur J Immunol* 29, 4022-9 (1999).

13. Fernandez, N.C. et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-11 (1999).

14. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. & Valiante, N.M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-41 (2002).

15. Degli-Esposti, M.A. & Smyth, M.J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5, 112-24 (2005).

16. Ferlazzo, G. et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-11 (2004).

17. Ferlazzo, G. et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-51 (2002).

18. Borg, C. et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104, 3267-75 (2004).

19. Marcenaro, E. et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 174, 3992-8 (2005).

20. Semino, C., Angelini, G., Poggi, A. & Rubartelli, A. NK/iDC interaction results in IL18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106, 609-16 (2005).

21. Vitale, M. et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566-71 (2005).

22. Della Chiesa, M. et al. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33, 1657-66 (2003).

23. Park, J.S. et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C870-9 (2003).

24. Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H. & Nakagawara, A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent

10

20

30

40

sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem* 277, 715764 (2002).

25. Gardella, S. et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3, 995-1001 (2002).

26. Zeh, H.J., 3rd & Lotze, M.T. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 28, 1-9 (2005).

27. Lotze, M.T. & Tracey, K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331-42 (2005).

28. Bianchi, M.E. & Manfredi, A.A. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220, 35-46 (2007).

29. Andoniou, C.E. et al. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* 6, 1011-9 (2005).

30. Mavilio, D. et al. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 203, 2339-50 (2006).

31. Mollica, L. et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 14, 431-41 (2007).

32. Moser, B., Herold, K.C. & Schmidt, A.M. Receptor for advanced glycation end products and its ligands: initiators or amplifiers of joint inflammation--a bit of both? *Arthritis Rheum* 54, 14-8 (2006).

33. Bierhaus, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83, 876-86 (2005).

34. Yu, M. et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26, 174-9 (2006).

35. Clynes, R. et al. Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr Mol Med* 7, 743-51 (2007).

36. Manfredi, A.A. et al. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol* 180, 2270-5 (2008).

37. Mailliard, R.B. et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171, 2366-73 (2003).

10

20

30

40

38. Nowak, P. et al. HMGB1 activates replication of latent HIV-1 in a monocytic cell-line, but inhibits HIV-1 replication in primary macrophages. *Cytokine* 34, 17-23 (2006).

39. Thierry, S. et al. High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *Aids* 21, 283-92 (2007).

40. Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. & Steinman, R.M. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72, 2733-7 (1998).

10

41. Canque, B. et al. The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 93, 3866-75 (1999).

42. Turville, S.G. et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170-9 (2004).

20

43. Nobile, C. et al. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol* 79, 5386-99 (2005).

44. Burleigh, L. et al. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 80, 2949-57 (2006).

45. Yang, D. et al. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 81, 59-66 (2007).

30

46. Dumitriu, I.E., Bianchi, M.E., Bacci, M., Manfredi, A.A. & Rovere-Querini, P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol* 81, 84-91 (2007).

47. Nowak, P., Barqasho, B. & Sonnerborg, A. Elevated plasma levels of high mobility group box protein 1 in patients with HIV-1 infection. *Aids* 21, 869-71 (2007).

48. Dumitriu, I.E. et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 174, 7506-15 (2005).

40

49. Fehniger, T.A. et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12:

implications for the innate immune response. *J Immunol* 162, 4511-20 (1999).

50. Agaoglu, S., Marcenaro, E., Ferranti, B., Moretta, L. & Moretta, A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18 or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* (2008).

51. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. & Patterson, S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101, 4505-11 (2003).

52. Smed-Sorensen, A., Lore, K., Walther-Jallow, L., Andersson, J. & Spetz, A.L. HIV-1 infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* 104, 2810-7 (2004).

53. Kiertcher, S.M. & Roth, M.D. Human CD14<sup>+</sup> leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59, 208-18 (1996).

54. Saidi, H. et al. Pre-clinical development as microbicide of zinc tetra-ascorbo-camphorate, a novel terpenoid derivative: Potent in vitro inhibitory activity against both R5- and X4-tropic HIV-1 strains without significant in vivo mucosal toxicity. *AIDS Res Ther* 5, 10 (2008).

55. Lecoœur, H., Melki, M.T., Saidi, H. & Gougeon, M.L. Analysis of Apoptotic Pathways by Multiparametric Flow Cytometry: Application to HIV Infection. *Methods Enzymol* 442, 51-82 (2008).

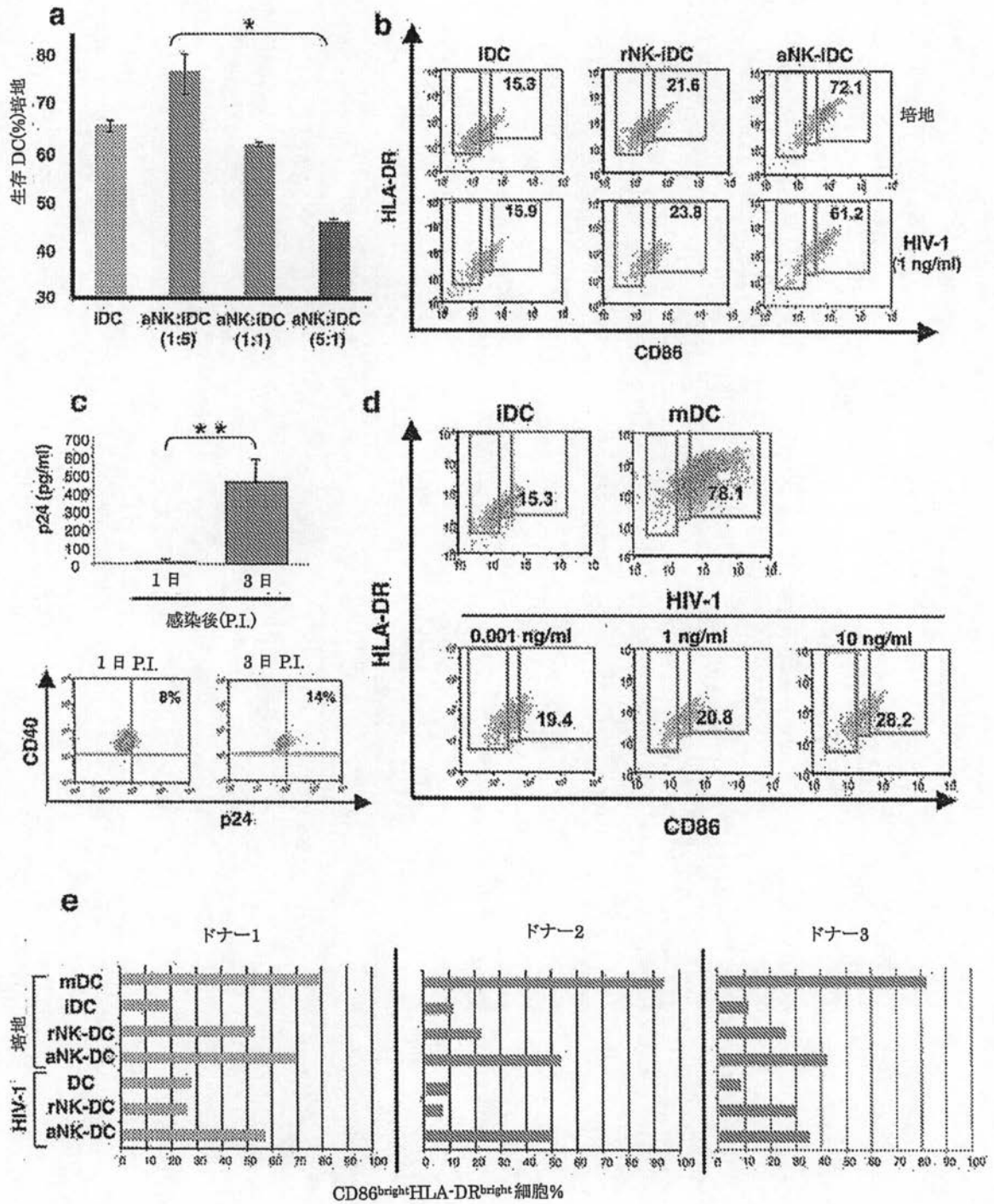
56. Ledru, E. et al. A nonsecreted variant of interleukin-4 is associated with apoptosis: implication for the T helper-2 polarization in HIV infection. *Blood* 101, 3102-5 (2003).

10

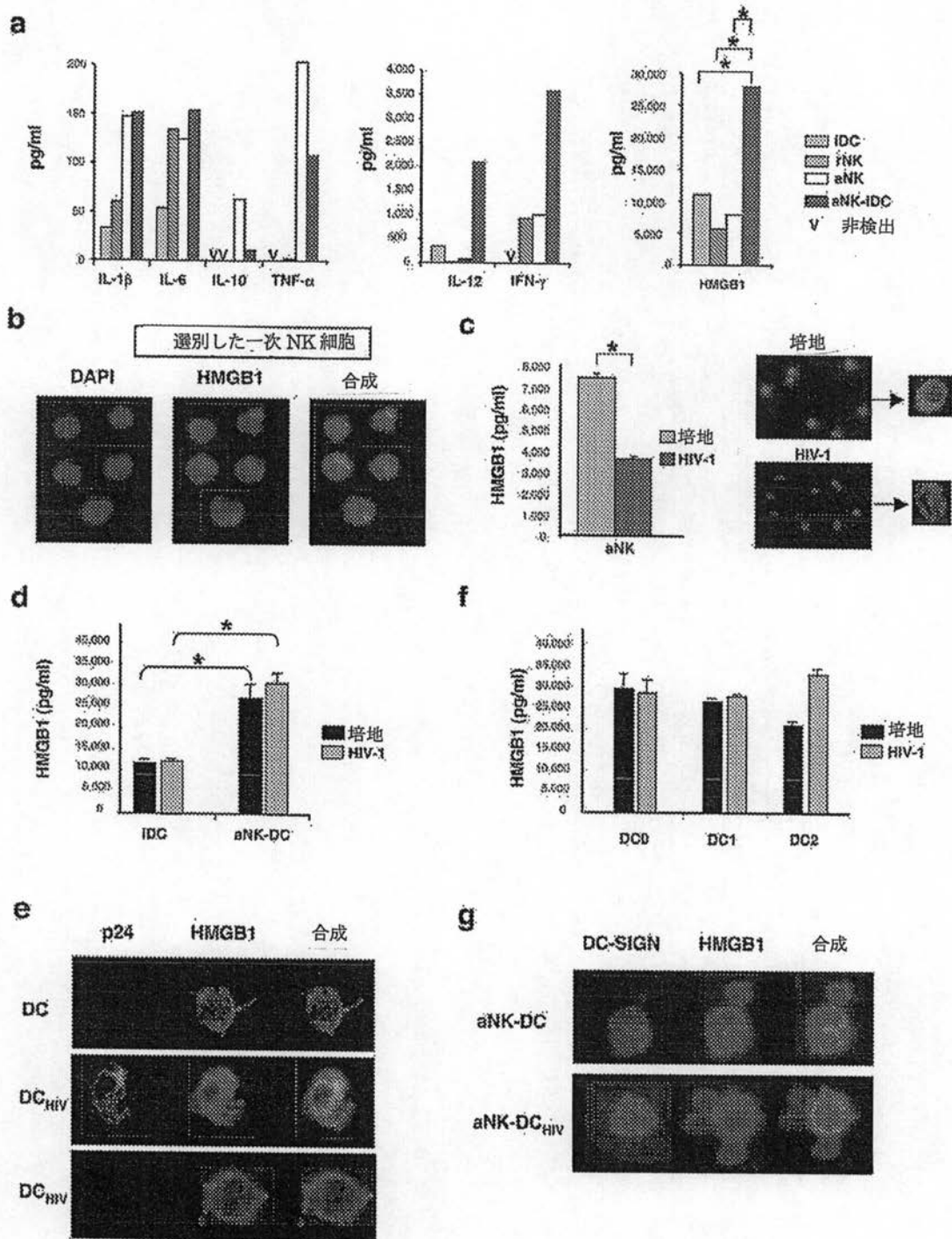
20

30

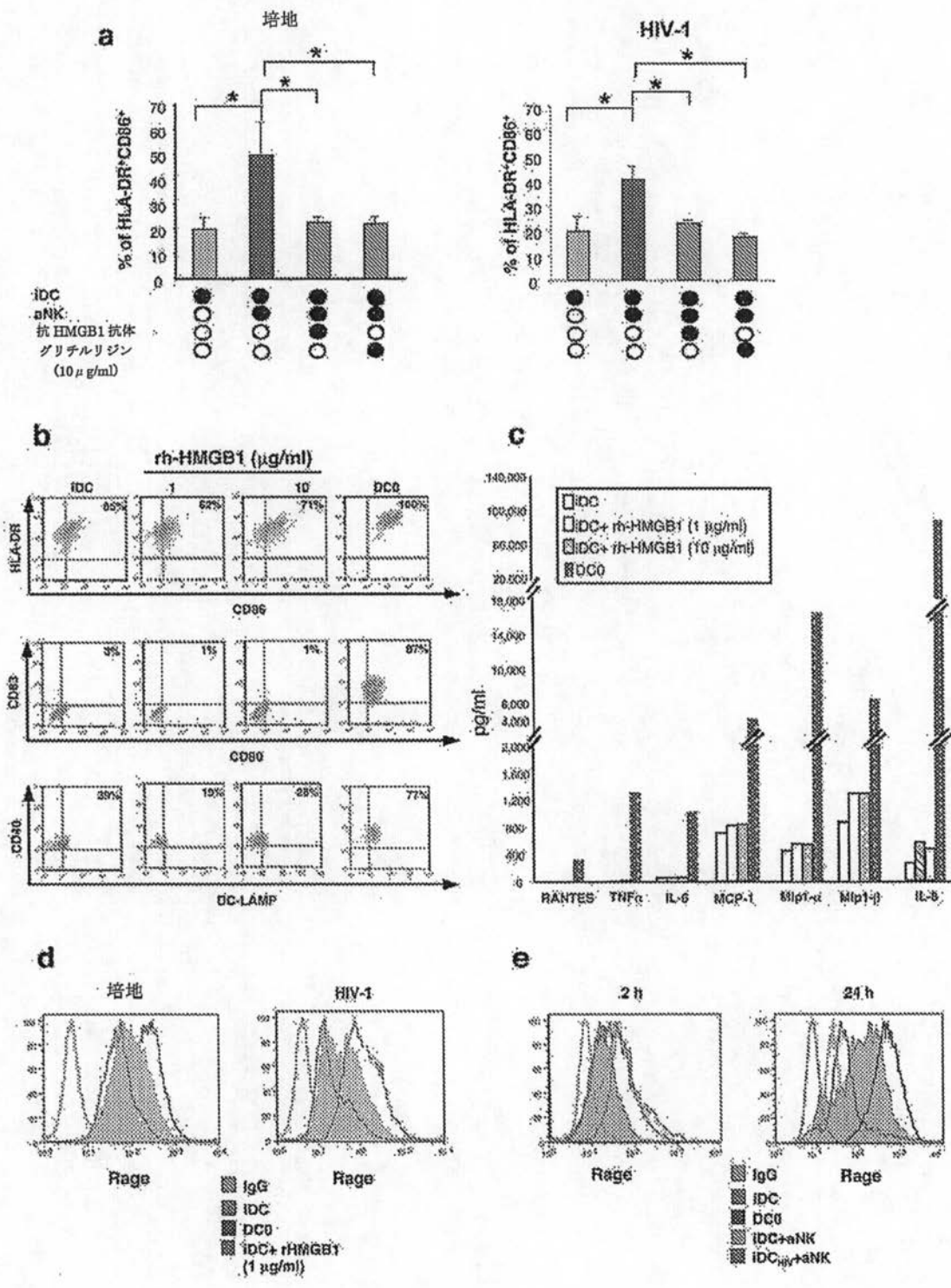
【 図 1 】



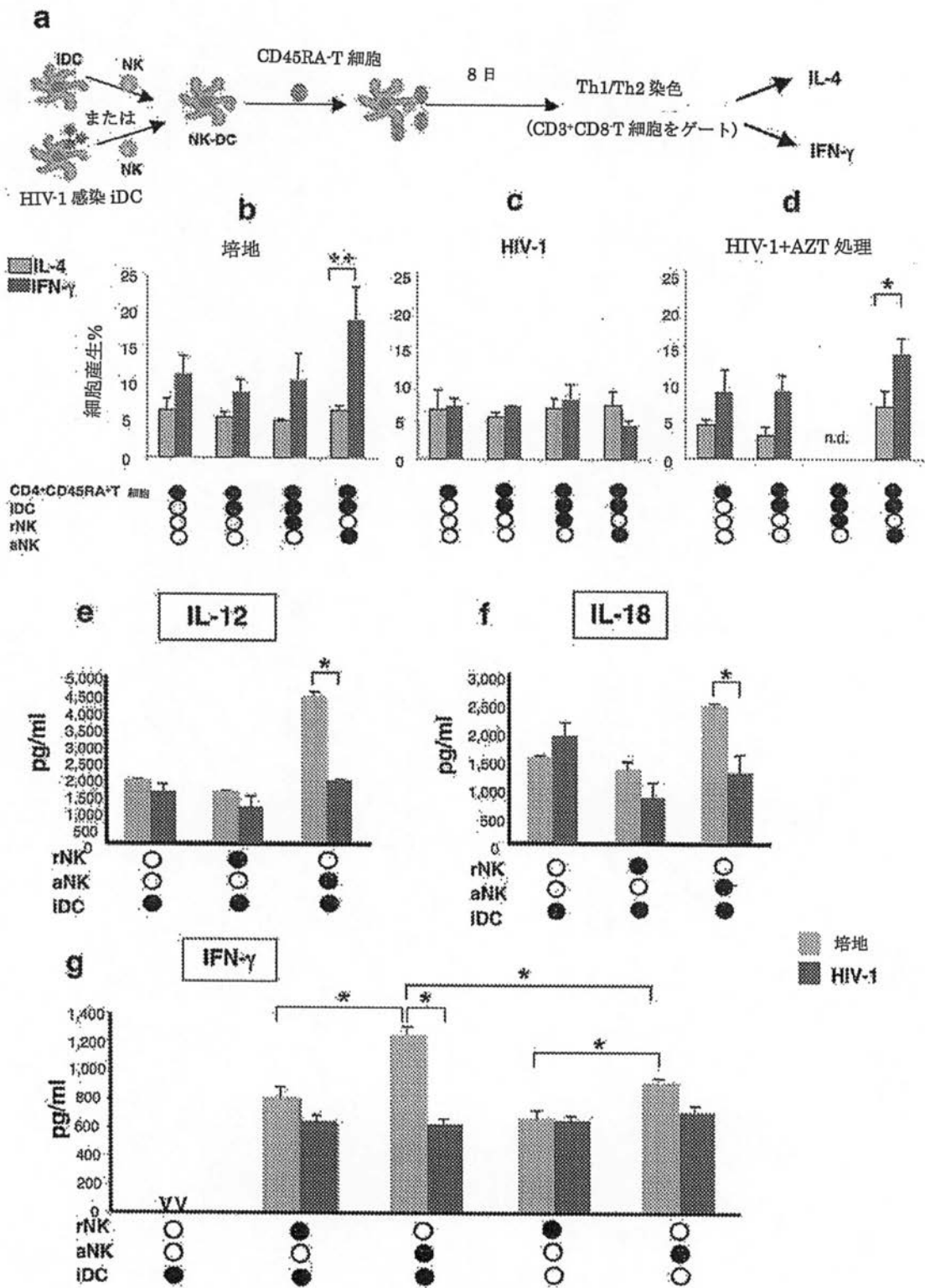
【 図 2 】



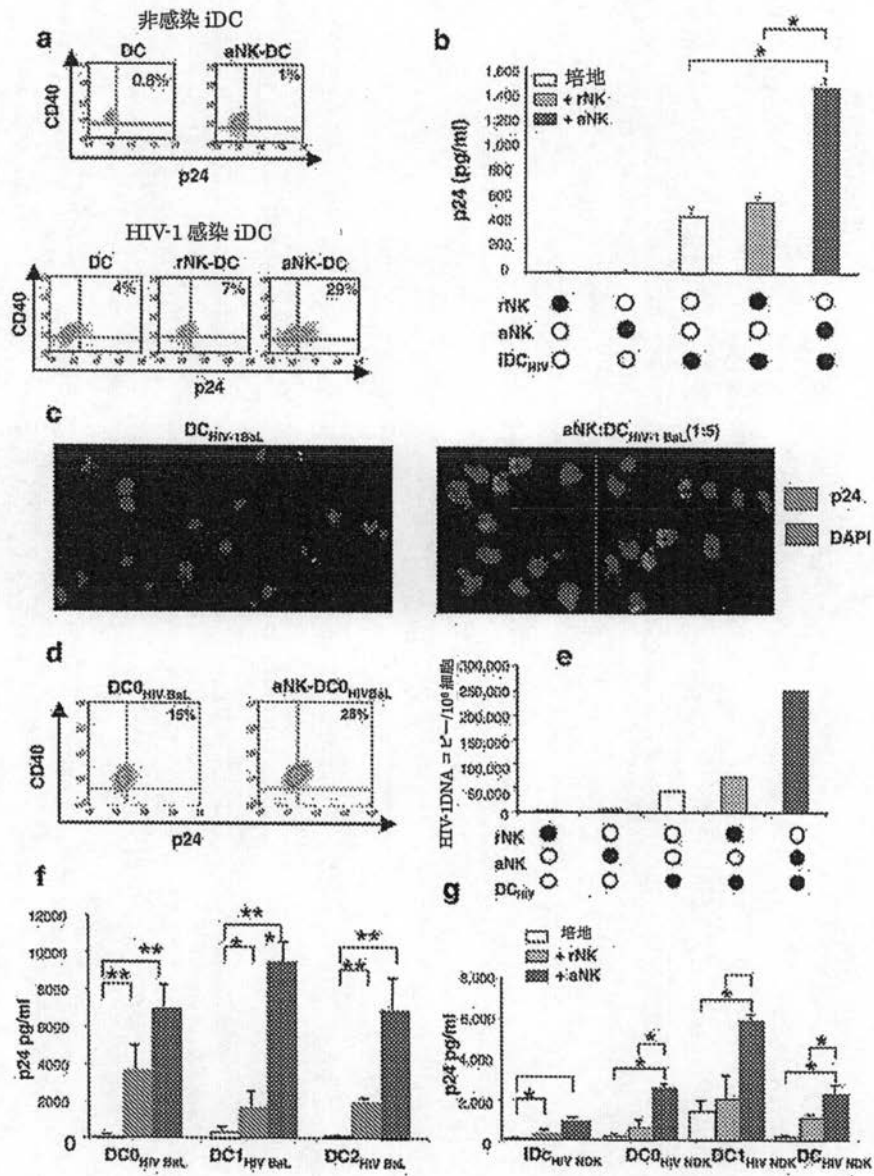
【 図 3 】



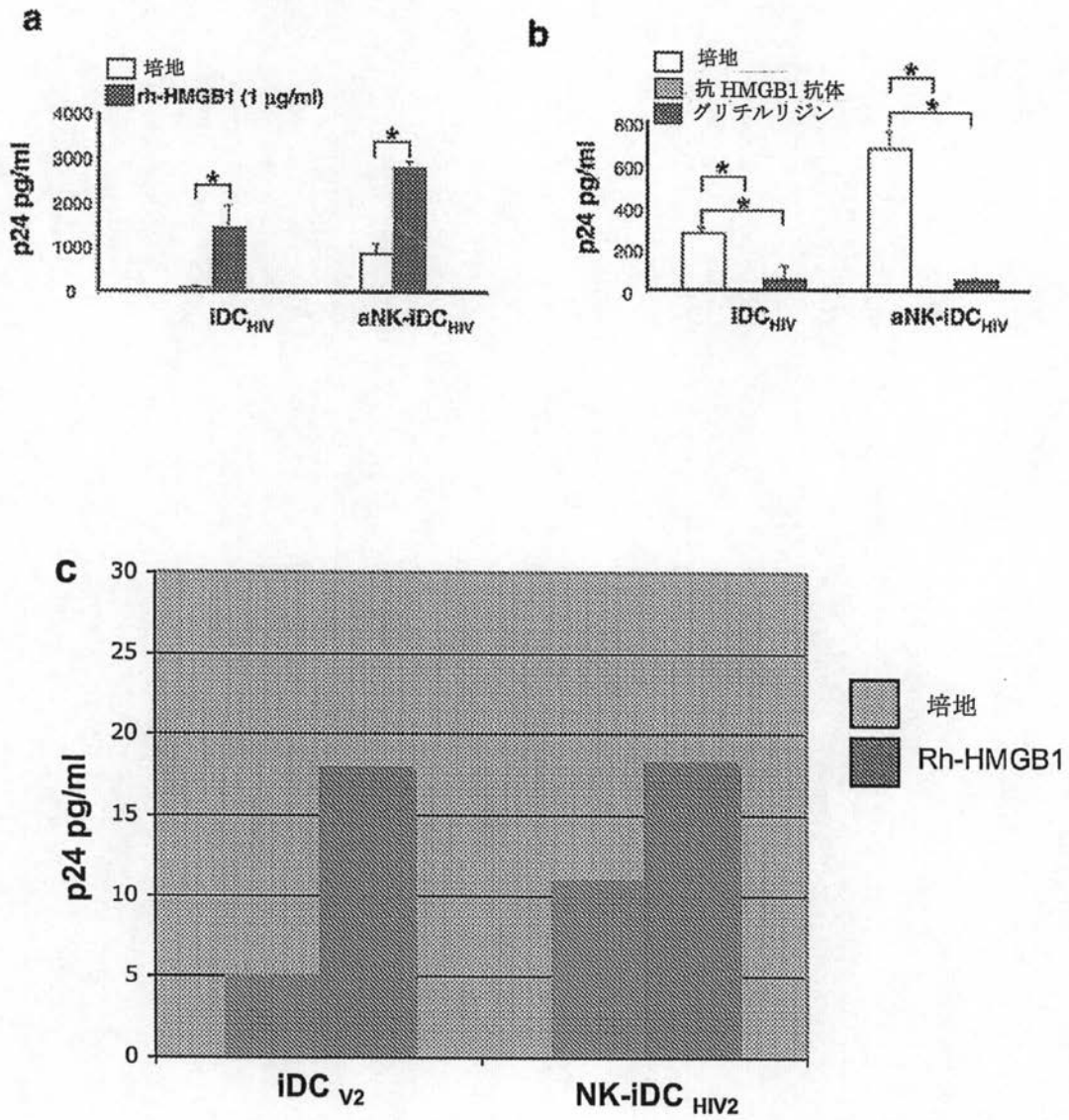
【 図 4 】



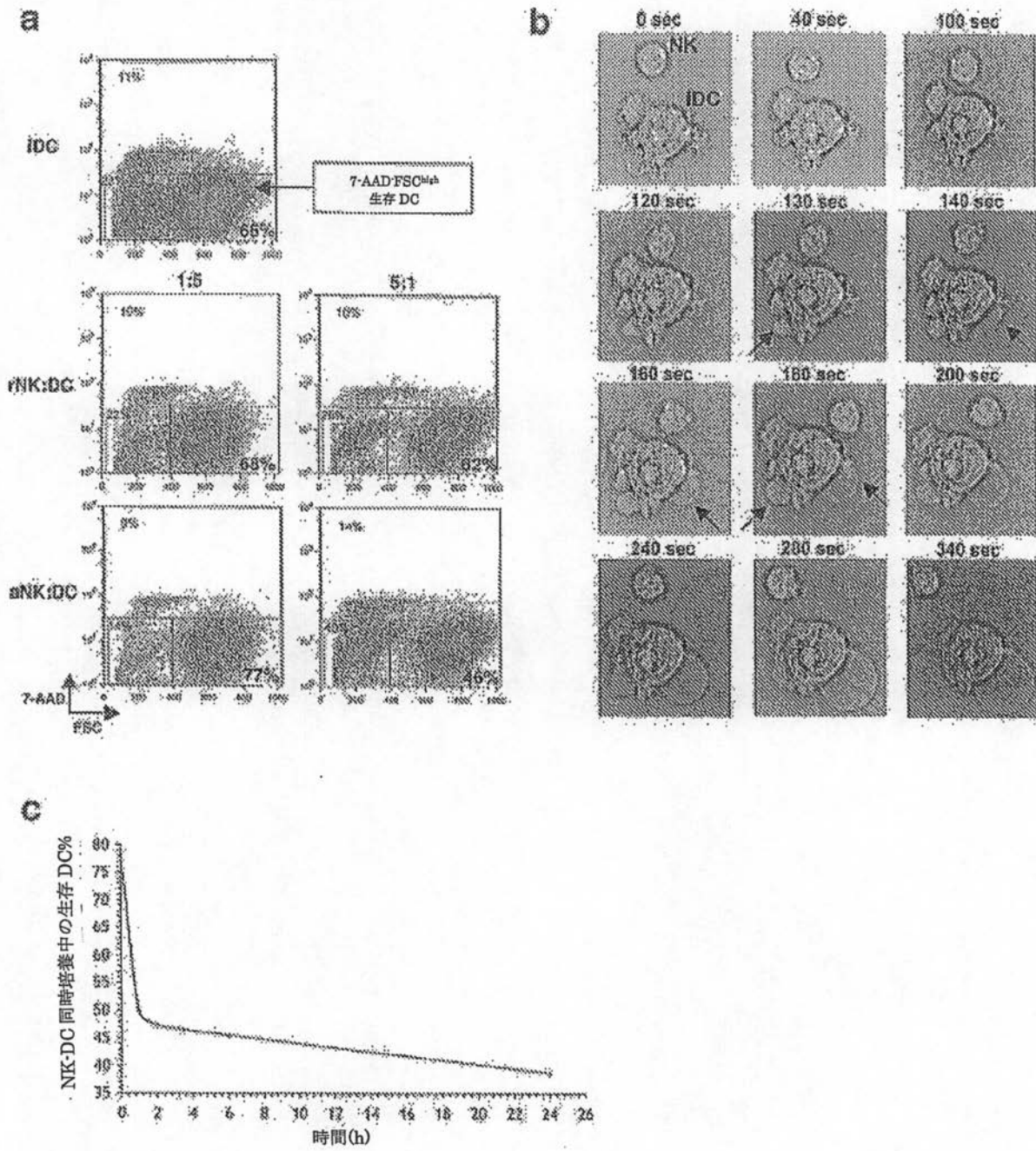
【 図 5 】



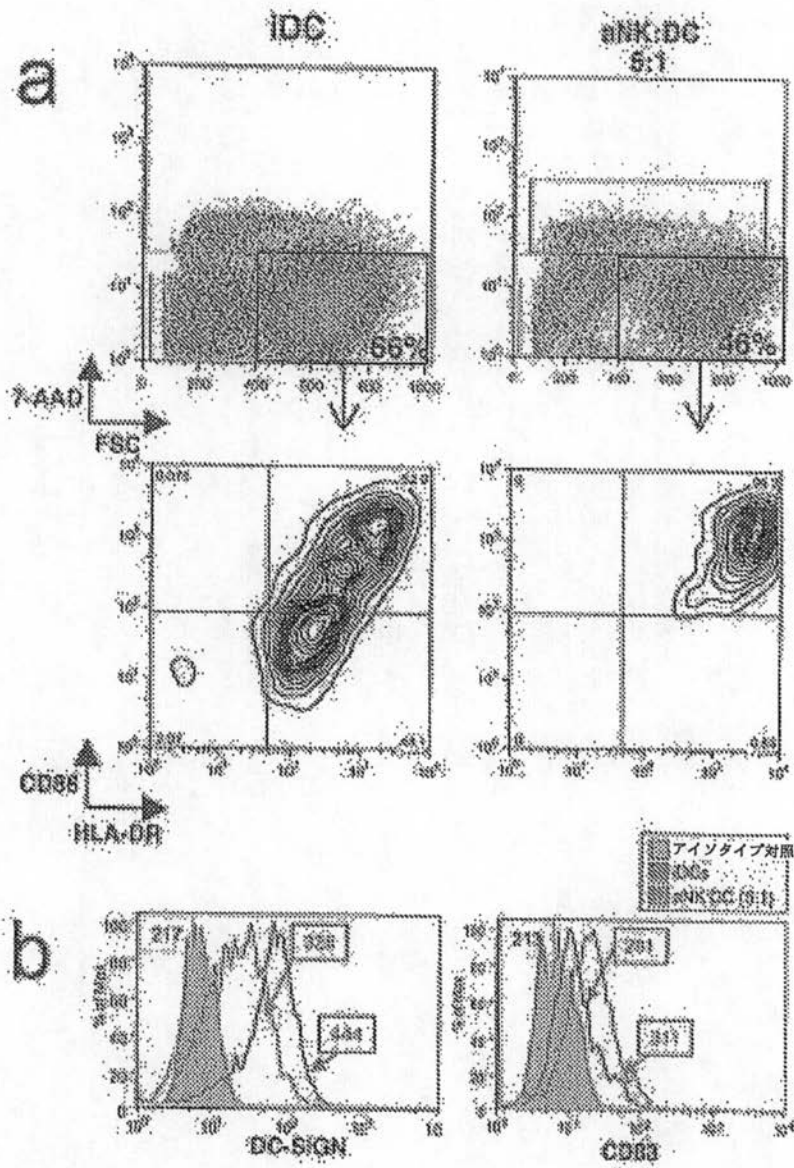
【 図 6 】



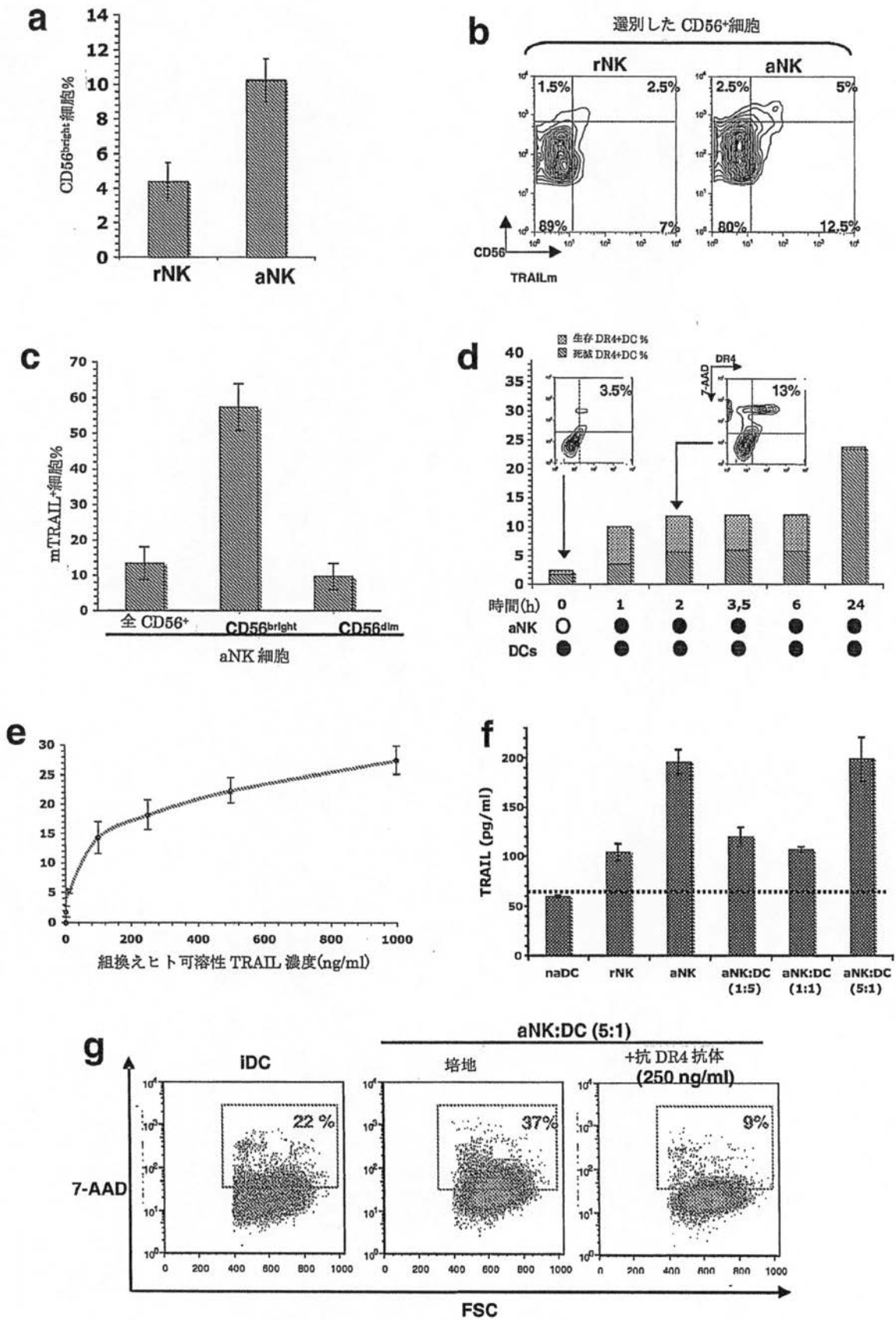
【 図 7 】



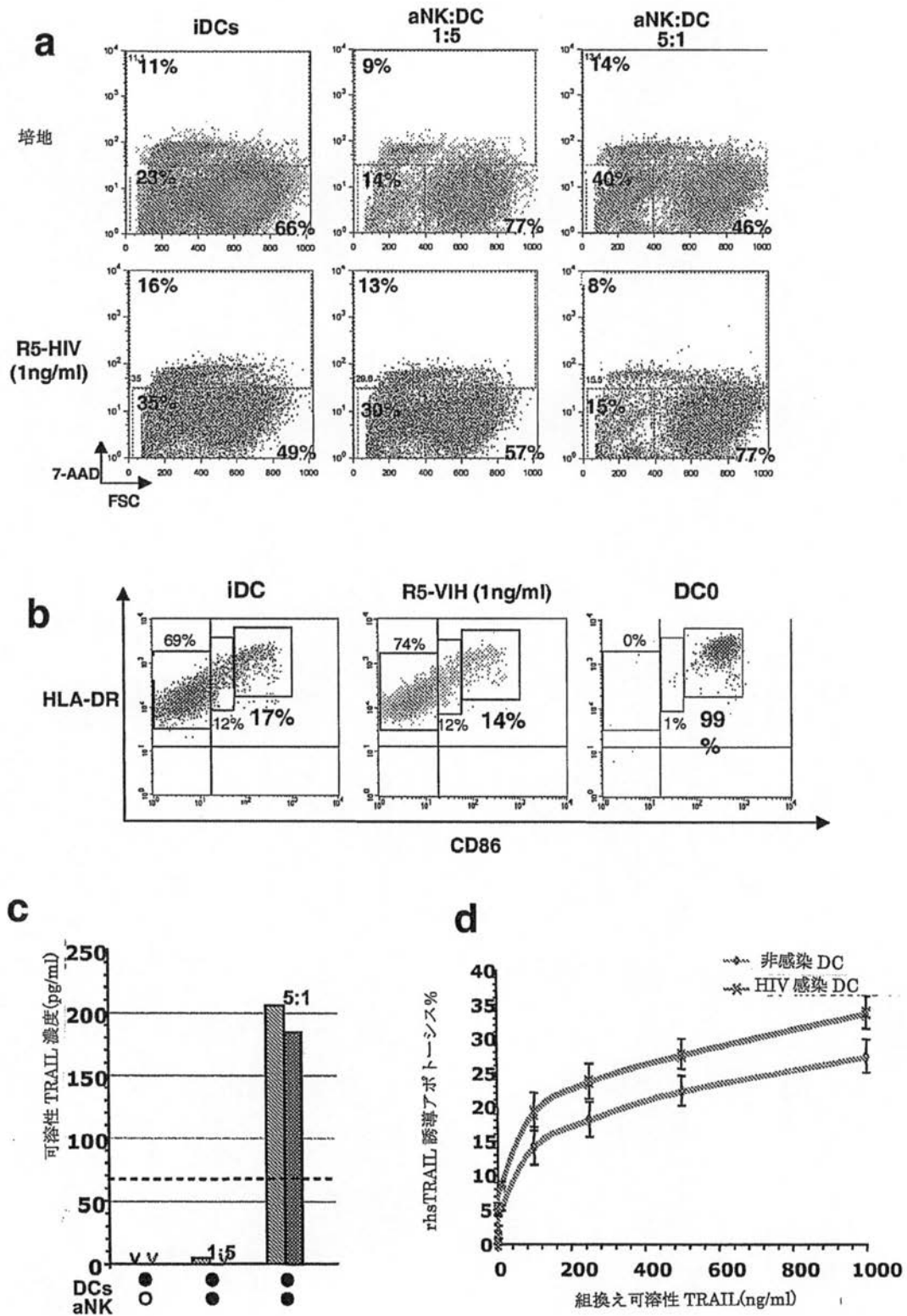
【 図 8 】



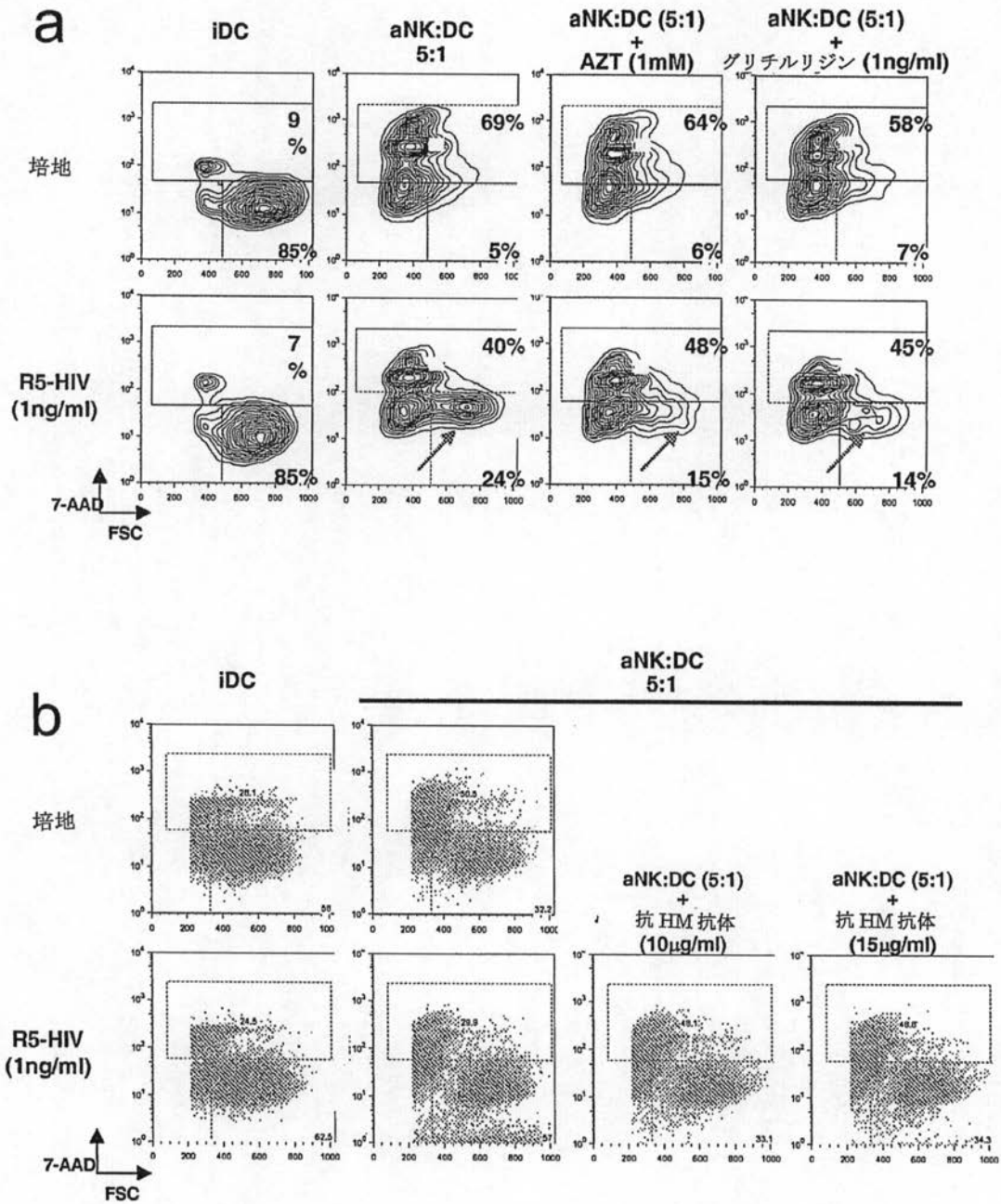
【 図 9 】



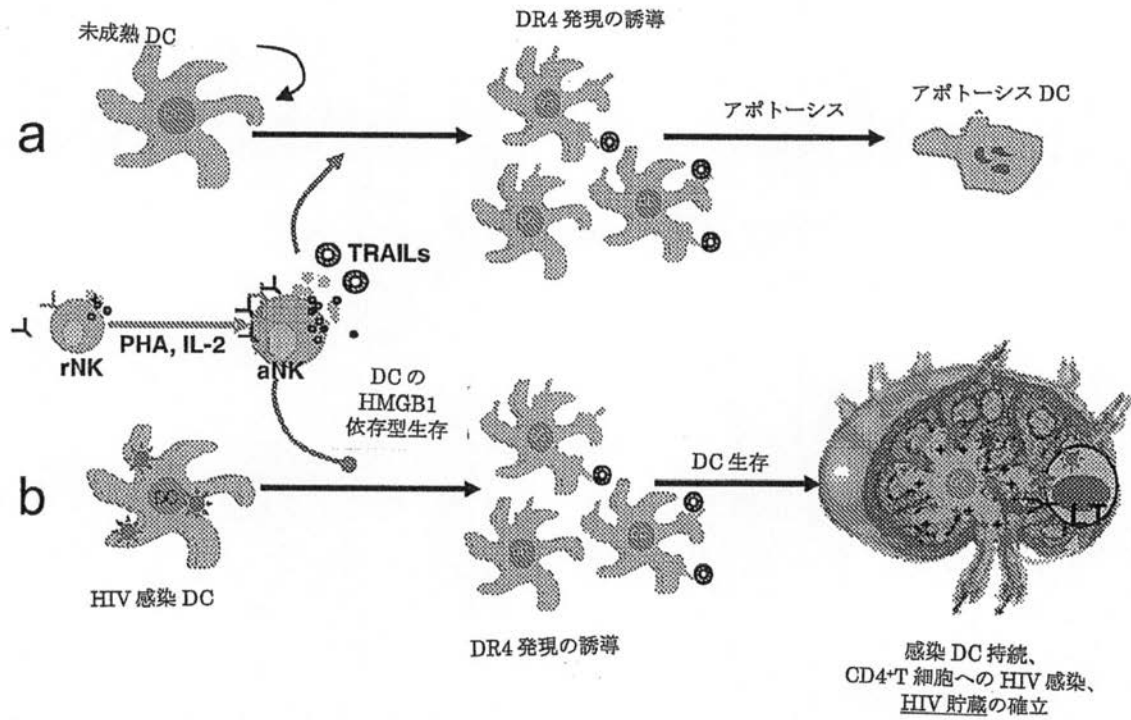
【 図 1 0 】



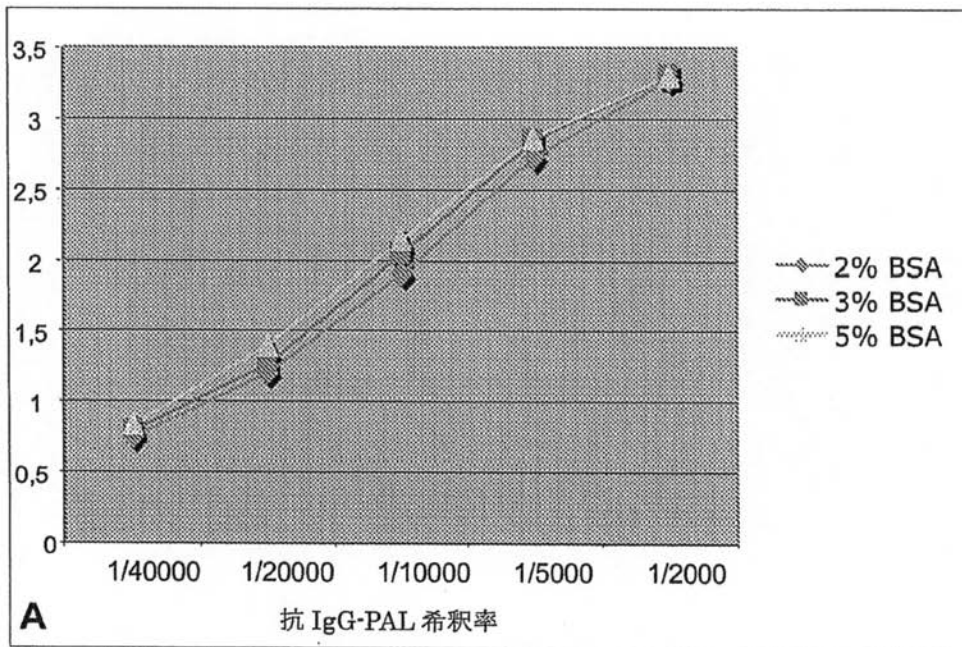
【 図 1 1 】



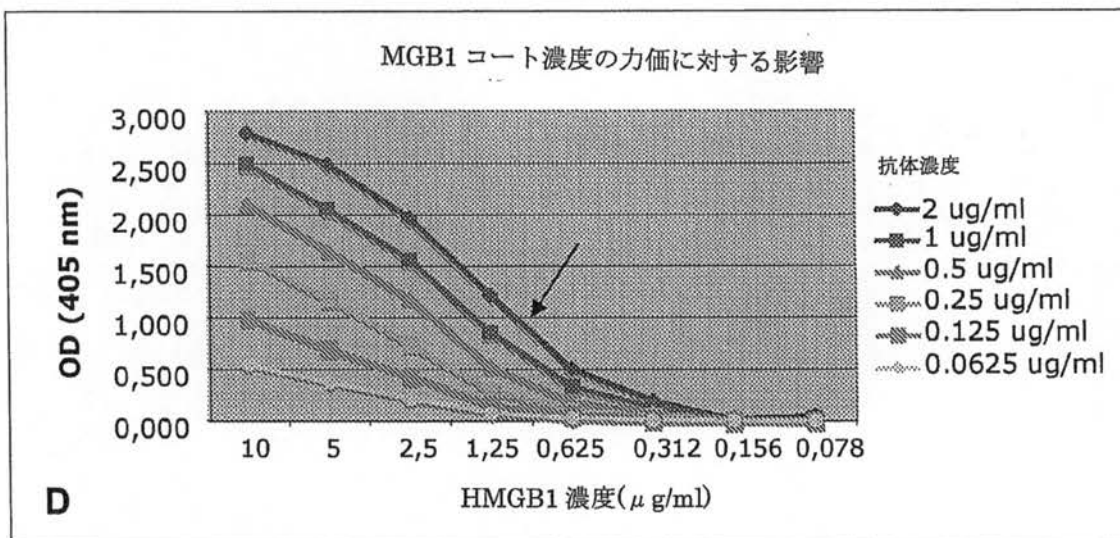
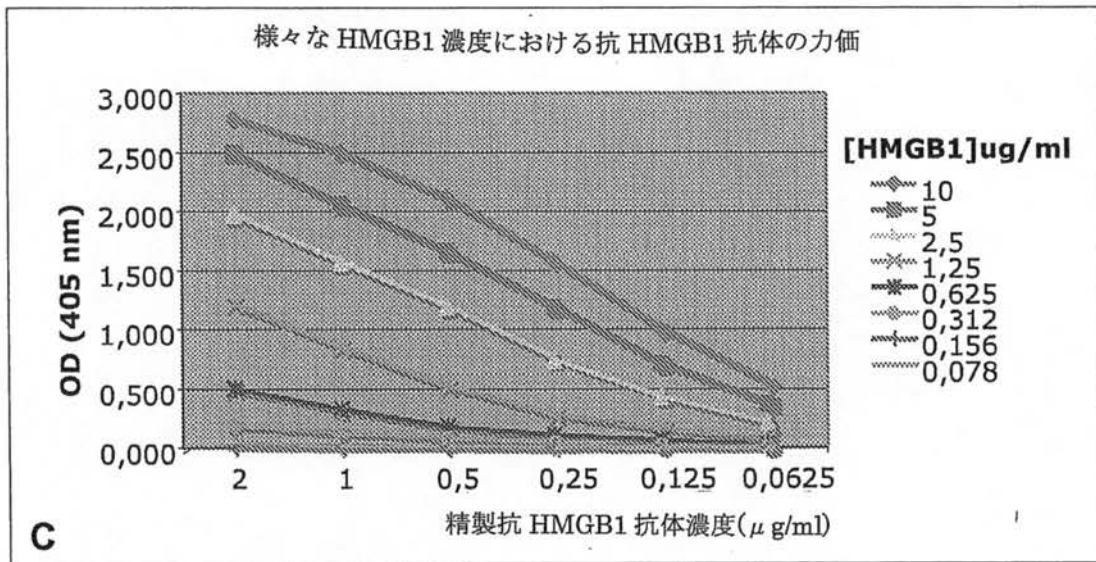
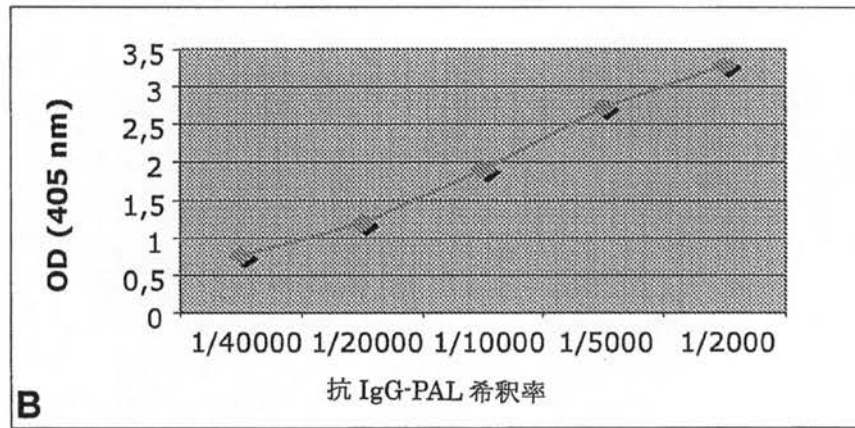
【 図 1 2 】



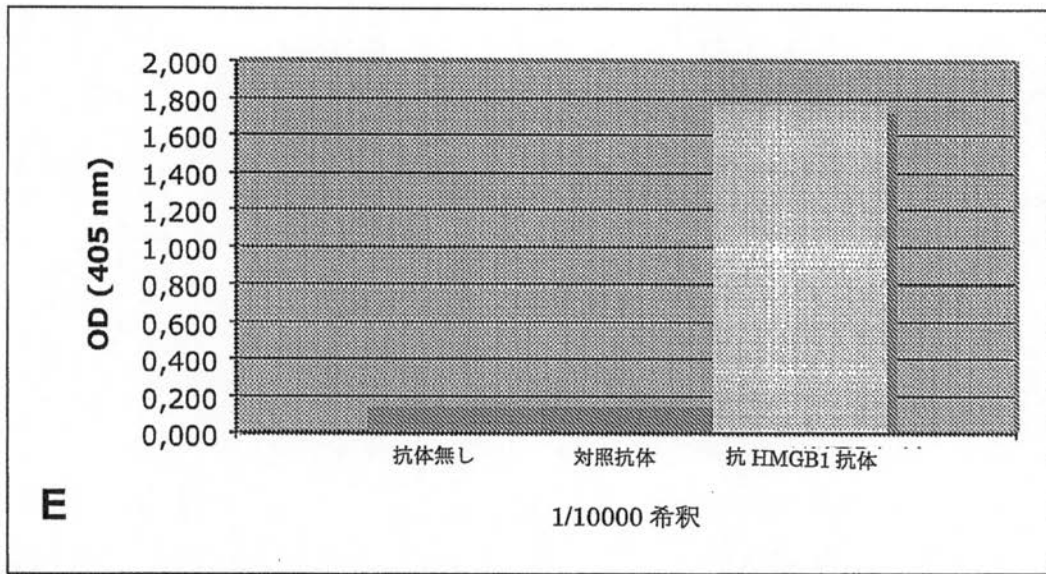
【 図 1 3 - 1 】



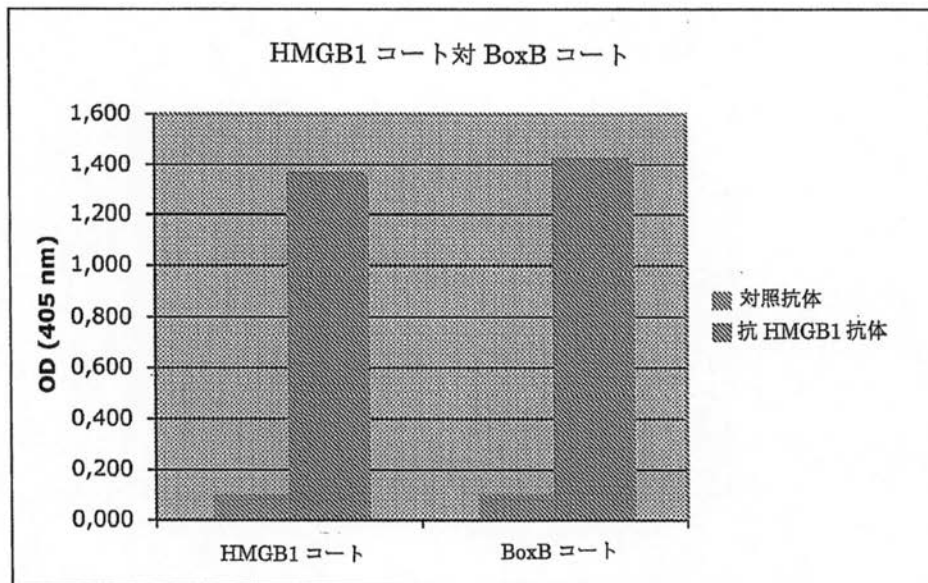
【 図 1 3 - 2 】



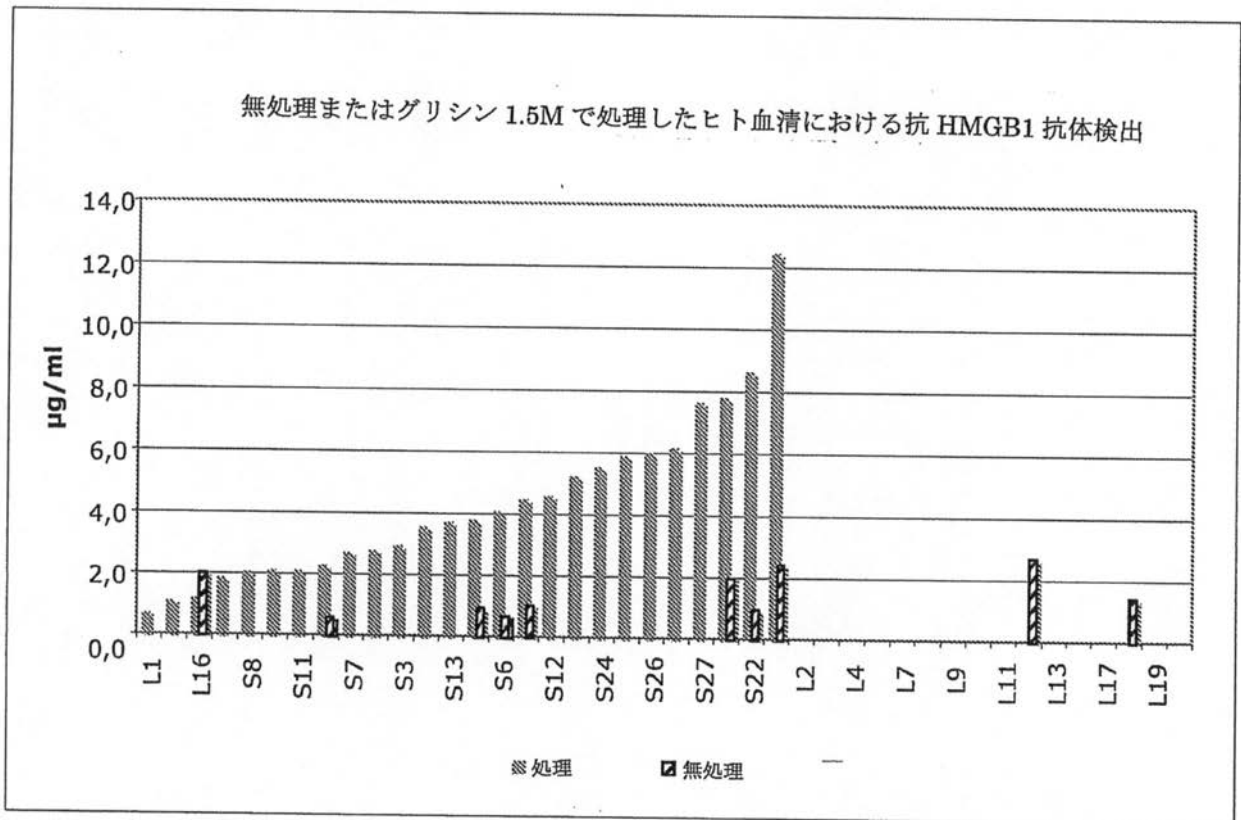
【 図 1 3 - 3 】



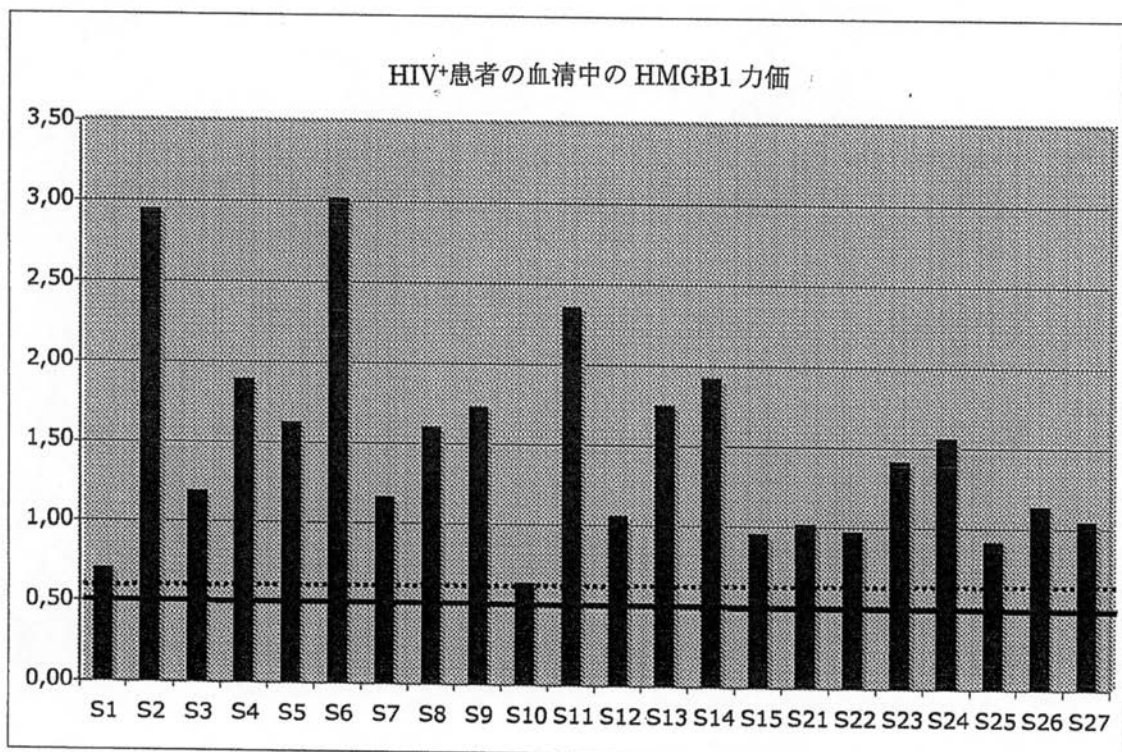
【 図 1 4 】



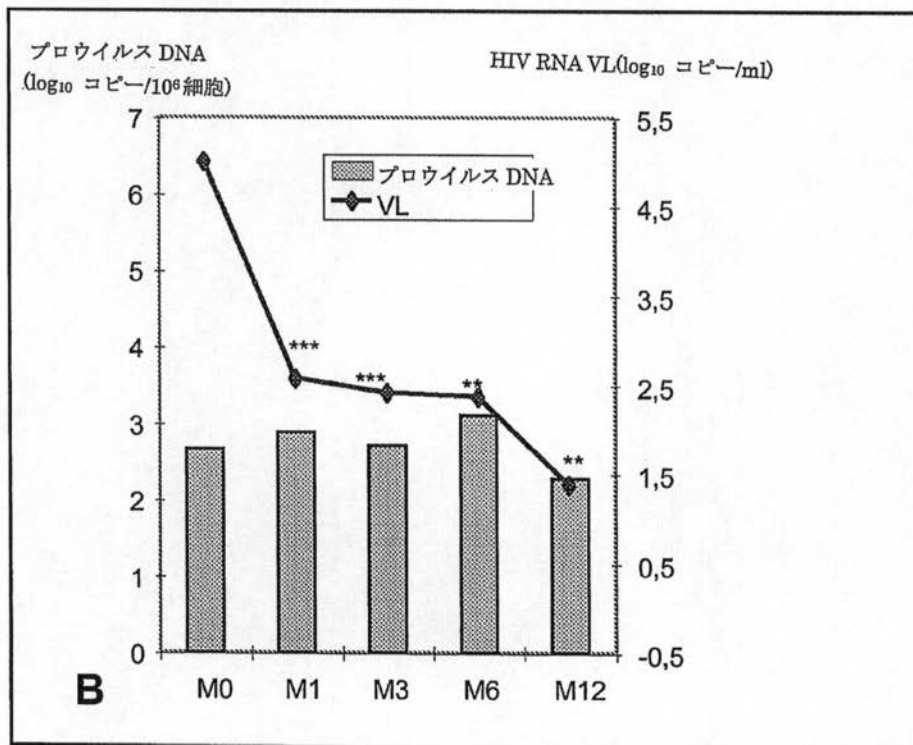
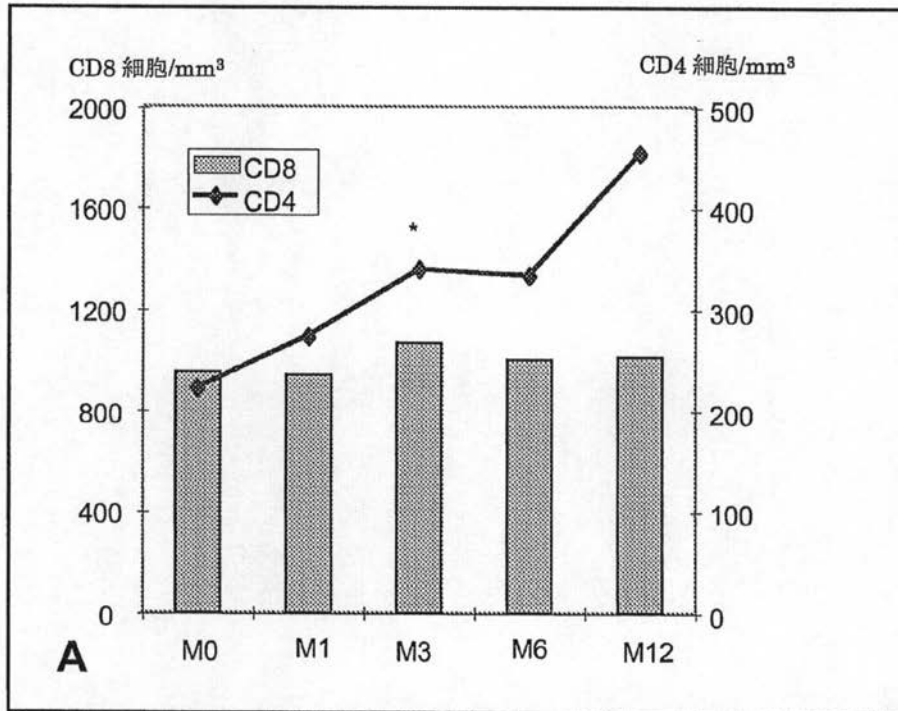
【 図 1 5 】



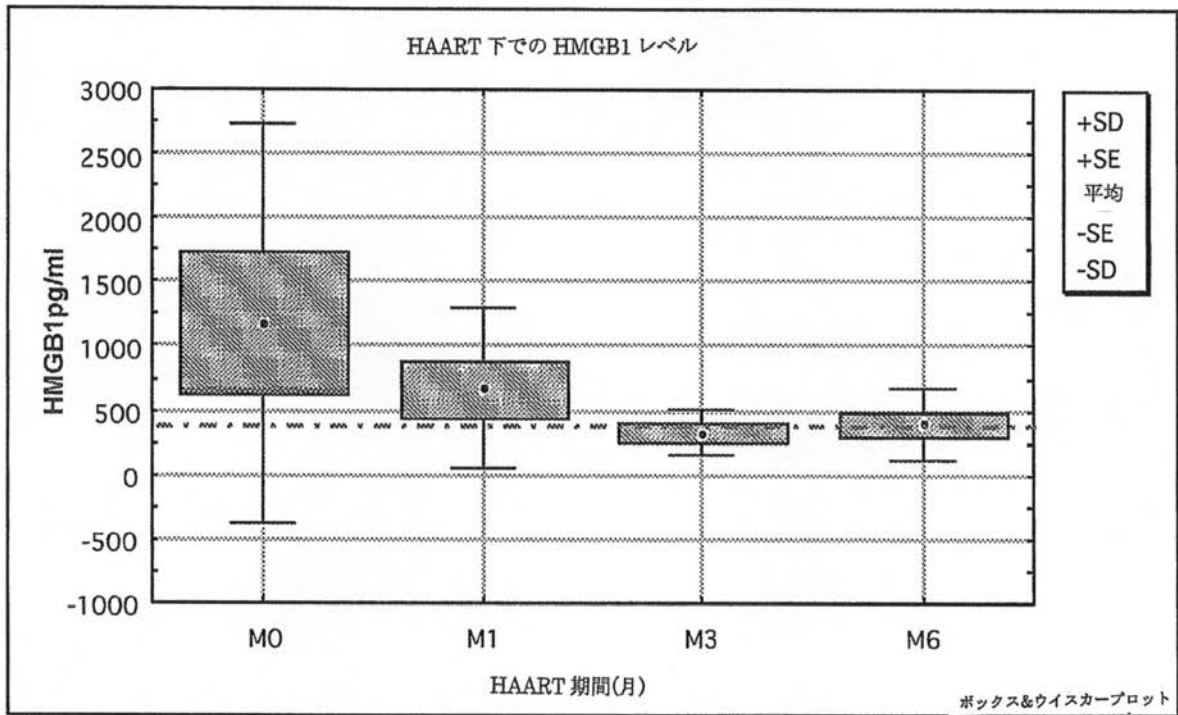
【 図 1 6 】



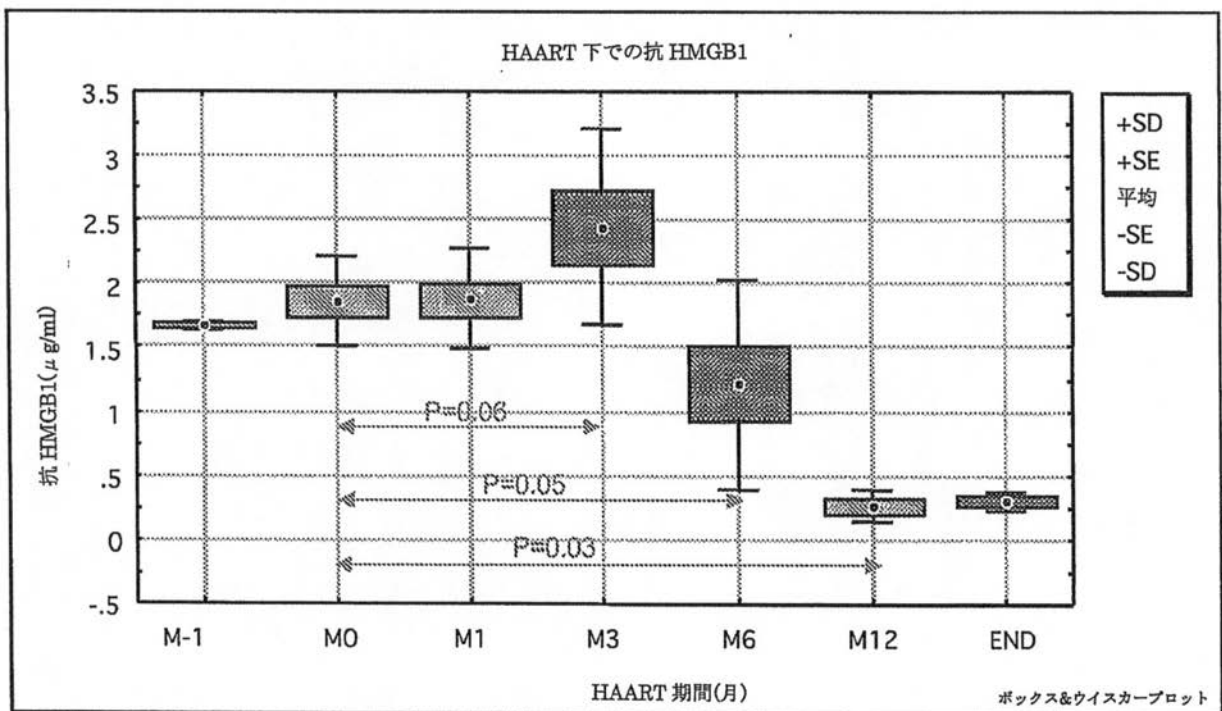
【 図 1 7 】



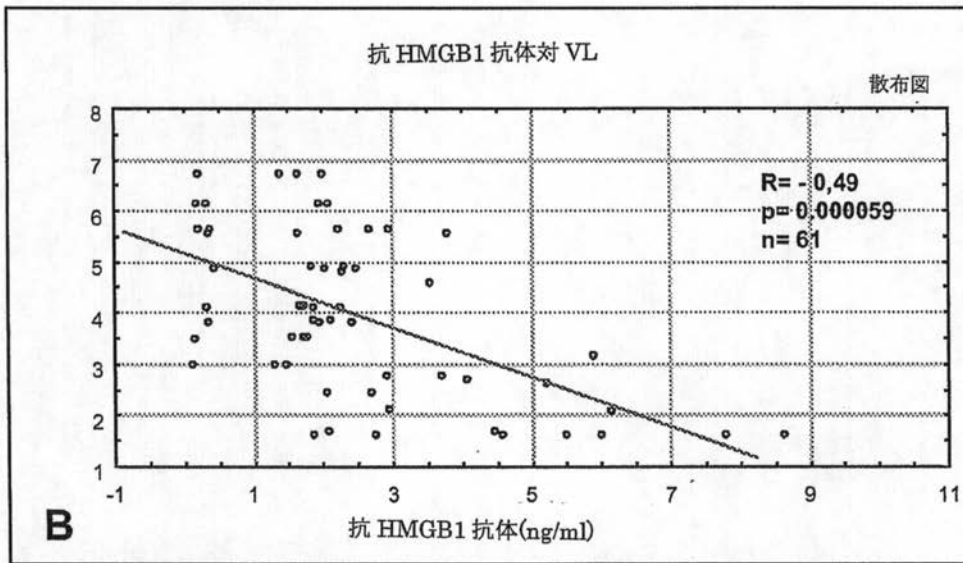
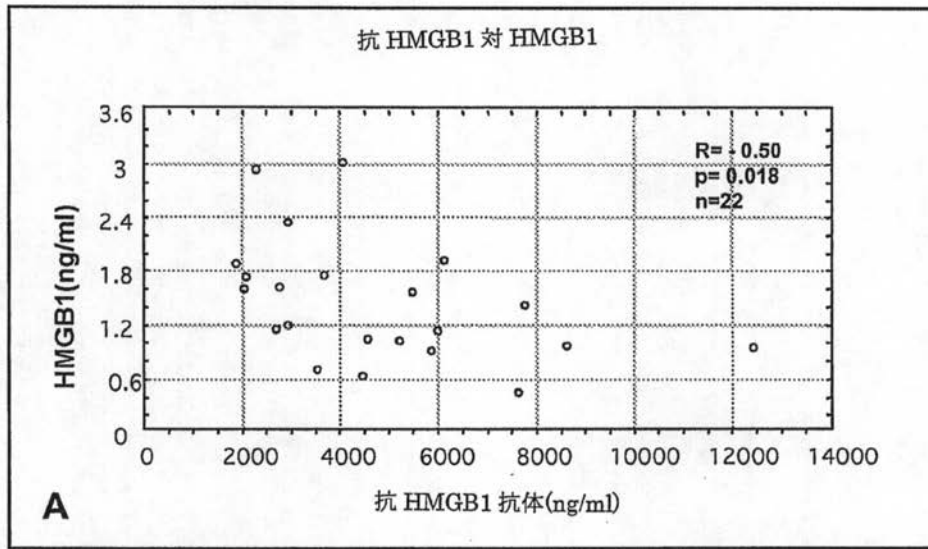
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 图 2 0 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 マリー - リーズ・ゲージョン  
フランス・9 2 1 4 0・クラマル・リュ・ドゥ・フルーリー・4 7
- (72)発明者 ヘラ・サイディ  
フランス・7 5 0 1 9・パリ・パサージュ・デグレ・1
- (72)発明者 マリア - テレーズ・メルキ  
フランス・7 5 0 1 3・パリ・プラス・ドゥ・ランジス・5
- (72)発明者 ベアトリス・ポワリエ - ボードワン  
フランス・7 8 6 5 0・ベンヌ・プラス・ドゥ・レスタンダール・3
- (72)発明者 ヴァレリー・セファー  
フランス・9 1 8 0 0・ブリュノア・アヴニユ・ガリエニ・4・ビス

【外国語明細書】

2015034828000001.pdf

专利名称(译)	通过调节HMGB1依赖性诱导的HIV-1复制和持久性来监测和抑制人免疫缺陷病毒感染		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015034828A</a>	公开(公告)日	2015-02-19
申请号	JP2014222487	申请日	2014-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所		
[标]发明人	マリー・リーズ・グージョン ヘラサイディ マリアテレーズ・メルキ ヘアトリス・ポワリエ・ボードワン ヴァレリー・セファー		
发明人	マリー・リーズ・グージョン ヘラ・サイディ マリア・テレーズ・メルキ ヘアトリス・ポワリエ・ボードワン ヴァレリー・セファー		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	A61K31/00 A61K31/704 A61P31/18 A61P43/00 C12N2740/16011 G01N33/56988 G01N2333/16 G01N2333/4703 G01N2800/52 G01N33/6875		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/53.D G01N33/531.B		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/096135 2008-09-11 US		
其他公开文献	JP6138101B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种诊断和预后的方法，包括测量HMGB1水平和/或对HMGB1特异的抗体，并通过调节HMGB1的活性来治疗人免疫缺陷病毒感染。或提供降低其严重性的基于抗体和药物的方法。本发明提供了用于控制人免疫缺陷病毒(HIV)感染的组合物，其包含抑制高迁移率核1(HMGB1)蛋白与天然杀伤(NK)细胞相互作用的能力的物质。以及方法和治疗组合物，其包含与HMGB1结合的抗体和诸如甘草甜素之类的试剂，以检测或监测HIV感染，包括检测或定量HMGB1或生物样品中对HMGB1特异的抗体。提供一种方法。[选择图]无

	患者						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
M0							
HIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	6.72	4.15	3.54	5.65	4.90	6.15	3.85
M1							
ΔHIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	3.72	2.37	1.50	3.51	2.09	2.35	1.46
M3							
ΔHIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	3.25	2.85	1.94	3.40	2.32	2.10	2.24
M6							
ΔHIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	4.82	2.85	1.40	3.96	2.30	0.81	2.24
M12							
ΔHIV-RNA (log <sub>10</sub> cp/ml)	4.84	2.85	2.24	2.88	3.30	2.21	2.55