

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV 感染症の治療開発に関する研究 (H15-エイズ-003)

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 岡田則子

平成16年4月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV 感染症の治療開発に関する研究	1
岡田則子	
(資料) 平成 15 年度 HIV 研究発表会	
II. 分担研究報告	
1. HIV 潜伏感染細胞に対するヒト IgM モノクローナル抗体の研究	14
岡田則子	
(資料) ヒト IgM 抗体 9F11 に関する研究発表	
2. 患者血液中 HIV 感染細胞の排除に関する研究	26
金田次弘	
(資料) HAART 施行中 HIV-1 感染者 HIV-1 DNA 研究発表	
3. HIV 感染患者からの LAK-T リンパ球に関する研究	33
岡田秀親	
(資料) 補体反応を制御するペプチドに関する研究発表	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物 別刷	46

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

HIV 感染症の治療開発に関する研究

主任研究者 岡田 則子 名古屋市立大学大学院分子医学研究所 助教授

研究要旨 細胞膜上には種特異的補体制御膜因子が存在するために、同種の補体反応は原則的に起こらない仕組みになっている。しかし、ヒト IgM は HIV 感染細胞に反応して補体による細胞溶解を起こすことができる。特にヒト IgM モノクローナル抗体である 9F11 は極めて効率よく感染細胞を破壊する。その標的抗原（9F11 抗原）を明らかにするために遺伝子クローニングを行い、70kD の分子（P70 と仮称）を同定した。しかし、HIV 感染細胞の Western ブロット解析では 30 kD に主要シグナルがあり、更なる解析が必要である。9F11 抗原は活性化 T リンパ球にも認められるが、調べた全ての HTLV-I 感染細胞株にも認められ、それ以外の白血病細胞株には認められなかった。HTLV-I 感染細胞株の 9F11 抗原も 30 kDa に強いシグナルを示した。未治療の患者末梢血の HIV 感染リンパ球は 9F11 と補体血清による処理で抑制できることを示す知見も得たが、症例数を増やしての検討が必要である。Nef が潜伏状態に近い状況の感染細胞に発現している可能性が高いので、Nef に対するヒト IgM 抗体である CF8 をリクローニングして、解析に供するための準備も行った。過剰な補体反応によって起こりうる炎症反応の副作用を防ぐ目的で、起炎因子である C5a アナフィラトキシンを阻害するペプチド剤の創生も行った。

分担研究者

金田次弘

国立名古屋病院血液免疫研究部・部長

岡田秀親

福祉村病院長寿医学研究所・所長

A. 研究目的

HIV 感染細胞に反応するヒト IgM モノクローナル抗体として 9F11 などを作成した。これらのヒト抗体は HIV が感染した株化培養細胞に補体と共に働いて細胞溶解を起こすことができる。そこで、これらのヒト抗体が HIV 感染患者の血液中に含まれる感染細胞や潜伏感染細胞を溶解除去できる可能性を検証する。また、Nef が慢性感染細胞の細胞膜上に発現して

いることを示す知見も得たので、Nef に対するヒト IgM 抗体（CF8 など）も同時に作用させたときの相乗効果も検討したい。9F11 が反応する抗原である 9F11 抗原を明らかにするため、感染細胞の cDNA ライブラリーから 9F11 抗原をコードする遺伝子の探索を、免疫スクリーニング法を活用して行い、9F11 抗原の同定を試みる。HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体が HIV 感染患者の血液中に含まれる感染細胞や潜伏感染細胞を障害除去できる可能性がある。その点を検討するために、HIV 感染患者末梢血のリンパ球に 9F11 などの IgM 抗体とヒト補体血清を作用させることにより、患者血液中の感染細胞を排除できることを

明らかにする。更に、患者リンパ球から感染細胞や潜伏感染細胞を除去して、抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激増殖させた Lymphokine Activated Killer T (LAK-T)リンパ球を作製して治療に応用する為の基礎的知見を集積する。一方、IgM 抗体を患者に投与すれば、感染細胞などに反応して強い補体活性化反応が起こることが想定される。そこで、補体反応に起因する過剰炎症反応による副作用の制御も想定して炎症抑制ペプチド剤の開発と応用も検討しておきたい。

B. 研究方法

9F11が反応する抗原分子を特定する。HIV感染細胞の mRNA から作製した cDNA ライブラリーを発現ベクターに組み込み、大腸菌等に導入発現させ、9F11抗原の cDNA を 9F11 を用いて免疫反応スクリーニングを行う。また 9F11 抗体を感染細胞に反応させたあと、抗体と抗原をリンカーで化学結合させて抗原抗体複合物を抽出精製する。そこからリンカーを切断し、抗原分子の同定を行う。抗原分子の同定には、二次元電気泳動法も活用する。精製分離した抗原やその断片のアミノ酸配列を解析して抗原分子の特定を行う。

HIV感染患者の末梢血リンパ球(必要に応じCD8陽性細胞は除去しておく)の初代培養に9F11等のヒトIgMモノクローナル抗体と新鮮ヒト血清を補体源として添加することによりHIVプロウイルスを保有した感染リンパ球を排除できる条件について検討を行う。プロウイルスの検出にはリアルタイムPCR法等を活用する。

Nefに対するヒトIgMモノクローナ

ル抗体CF8を作成できた。しかし、CF8細胞株の抗体産生効率が充分でないので、リクローニングを行ってCF8抗体の産生効率をたかめる。その上で、CF8による潜伏感染細胞との反応性の解析を行う。

患者末梢血からHIV感染細胞をIgM抗体と補体結成等で排除する実験を実施するために、HIV感染細胞のHIV-RNAのRT-PCR、による検出や、抗P24抗体を用いての検出条件についての基礎的検討を行う。

IgM抗体を大量に作製すると共に、抗体遺伝子をCHO細胞などに導入し、遺伝子組換え抗体の作製も試みる。IgM抗体を患者に投与して治療を行う場合には、過剰な補体反応による副作用の誘起も懸念される。そこで、過剰な補体反応による副作用に対処するため、C5a阻害ペプチド等を開発して、補体反応起因性の過剰炎症反応の制御に活用するための検討も行う。

(倫理面への配慮)

HIV 感染患者の末梢血を用いての解析に際しては、倫理委員会の承認のもとに、実験目的などを明確に説明して、書面による同意を得た上で実験を実施する。その際、得られた個人情報を守られるよう慎重に配慮する。

C. 研究結果

9F11 と反応する cDNA のスクリーニングにより、9F11 と反応するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。70 k Da の細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されていた分子であったが、細胞膜表面上に現れることは知られていなかったため、新たな発見である(分子名は特許申請に関わるので P70 と仮称する)。しかし、感染

細胞抽出タンパク質の Western ブロットでは 70 kDa のほかに 30 kDa に強いバンドが認められ、30 kDa の分子 (70 kDa の分子断片の可能性もある) の同定が必要である。

9F11 は HIV 感染細胞以外に、HTLV-I 感染細胞である MT2 や MT4 細胞株にも強い反応性を示し、補体存在下でそれらの細胞も溶解した。HTLV-I 感染細胞にも上記 30 kDa タンパク質の強いシグナルが検出された。HTLV-I 感染細胞以外の白血病細胞株などでは 9F11 抗原は検出されていない。しかし、正常人の T リンパ球を抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激増殖させると 9F11 抗原を発現する細胞が現れる。

HIV 感染患者末梢血リンパ球についての解析においては、倫理委員会の認可に手間取ったことと、初代培養リンパ球からの HIV-RNA の安定した検出定量法の確立が容易でなかったため、9F11 による抑制効果の確認は 1 症例のみに止まっている。CF8 細胞株のリクローニングは培養条件などで手間取っており、更なる改善を試みている。

C5a アナフィラトキシンを阻害する相補性ペプチドとしては、強力な阻害活性を示す 17 アミノ酸からなるペプチド剤 (ASGAPAPGPAGPLRPMF) を創生することができた。そのペプチドを Pep-A と命名したが、ラットのショック死モデルで救命効果も発揮できることを確認した。

D. 考察

9F11 抗原は HIV の遺伝子にコードされているのではなく、HIV 感染により発現誘導され、しかも細胞膜上に現れる分子であることがわかった。これは HTLV-I でも同様な現象が起こるこ

とがわかったので、レトロウイルス感染に共通する現象の可能性もある。9F11 と反応する抗原分子は 70 kDa のシグナル伝達に関わる分子であるが、9F11 が反応する細胞には、30 kDa の抗原分子が検出され、その点に関する解析が急務と考えている。正常人のリンパ球も抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激増殖させると 9F11 抗原を発現する細胞が現れてくるので、9F11 抗原は、分化抗原の一種と推察することもできる。従って、9F11 を治療に用いるときには、正常活性化リンパ球にも反応することを考慮に入れての細心の注意が必要である。

HIV 感染患者末梢血リンパ球に対する解析は容易でなかったため、9F11 と補体血清の処理で患者末梢血中の HIV 感染細胞を抑制できることを示せたのは 1 症例のみであった。従って、来年度以降への継続課題として残った。また、HTLV-I 感染細胞に 9F11 が反応してヒト補体による細胞溶解を起こすので、ATL に対する治療抗体としての活用も期待できると考えている。

Nef に対する CF8 抗体については、有用性を示す知見を得るに至らなかった。十分な抗体量を用いて解析するために、CF8 産生のための工夫が必要である。生体内で起こりうる過剰補体反応による副作用の制御に活用できる C5a 阻害ペプチドの Pep-A を創生できたので、その改良と活用法を次年度以降に検討したい。一方、9F11 などのヒト IgM 抗体を大量に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え、検討を開始した。

E. 結論

9F11 抗原の遺伝子を同定できたこ

とは、今後の展開に大きく貢献できる。また、HTLV-I 感染細胞にも 9F11 が反応することがわかったことも大きな成果と考えている。すなわち、HTLV-I 感染症患者への治療抗体として活用できる可能性があることは社会的意義も大きいと考えられる。しかし、感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対する有効性の確認は 1 症例に止まったので、次年度以降に症例を重ねての検討が必要である。

F. 健康危険情報

正常の活性化 T リンパ球にも 9F11 抗原が発現誘導されるものがあることがわかったので、それらの正常細胞に対する反応による副作用の可能性についての検討を慎重に行う必要がある。逆に、過剰に活性化した T リンパ球を抑制できるのであれば、自己免疫疾患や移植拒絶反応での緊急の免疫抑制剤として 9F11 を活用できる可能性もある。なお、生体内で、HIV 感染細胞に対して強力な補体反応が起こることによる急性炎症反応に属する副作用の可能性についても慎重に検討する必要がある。それに対処する手段の一つとして、C5a 阻害ペプチド剤を創生できたことは、有用な対策手段の一つとなると期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田 則子 (主任研究者)

- 1) Otake, K., Omoto, S., Yamamoto, T., Okuyama, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Saksena, N. K., and Fujii, Y. R. HIV-1 Nef protein in the nucleus induces adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS*, 18: 1-10 (2004)

- 2) Ohi, H., Tamano, M., Sudo, S., and Okada, N. Recombinant EPO therapy increases erythrocyte expression of complement regulatory proteins. *Am. J. Kidney Dis.*, 41: 179-85 (2003)
- 3) Shimomura, Y., Komura, H., Campbell, W., Okada, N., and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. *Microbiol. Immunol.*, 47: 241-245, (2003)
- 4) Kawai M., He, L., Kawamura, T., Omoto, S., Fujii, Y. R., and Okada, N. Chimeric human/murine monoclonal IgM antibodies to HIV-1 Nef antigen expressed on chronically infected cells. *Microbiol. Immunol.*, 47: 247-253 (2003)
- 5) Tani, S., Akatsu, H., Ishikawa, Y., Okada, N., and Okada, H. Preferential detection of procarboxypeptidase R by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.*, 47: 295-300 (2003)
- 6) Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyi, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N., and Okada, H. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Immunol.*, 170: 5764-5771 (2003)
- 7) Ahmad, S. R., Lindington, E. A., Ohta, R., Okada, N., Robson, M. G., Davis, K. A., Leiyges, D. M., Harris, C. L., Haskard, D. O., and Mason, J. Decay-accelerating factor induction by TNF α , through a phosphatidylinositol-3 kinase and protein kinase C-dependent pathway, protects murine vascular endothelial cells against complement deposition. *Immunology*, 110: 258-268 (2003)
- 8) Yoshioka, Y., Suzuki, R., Okamoto, T.,

Okada, N., Mukai, Y., Dshibuta, H., Tsutsumi, Y., Dohi, N., Okada, N., Nakagawa, S., and Mayumi, T. Combination effects of complement regulatory proteins and anti-complement polymer. **B. B. A.**, 1624: 54-59 (2003)

金田 次弘 (分担研究者)

- 1) Oki, T., Usami, Y., Nakai, M., Sagisaka, M., Ito, H., Nagaoka, K., Mamiya, N., Yamanaka, K., Utsumi, M., Kaneda, T. Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers **Biol. Pharm. Bull.**, in press
- 2) Usami, Y., Oki, T., Nakai, M., Sagisaka, M., and Kaneda, T. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir Ritonavir and Efavirenz **Chem. Pharm. Bull.** 51: 715-718 (2003)
- 3) Ibe, S., Hotta, N., Takeo, U., Tawada, Y., Mamiya, N., Yamanaka, K., Utsumi, M., and Kaneda, T. Prevalence of Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-Naïve Patients and Usefulness of Genotype Testing **Microbiol. Immunol.**, 47: 499-505 (2003)
- 4) Hattori, J., Ibe, S., Nagai, H., Wada, K., Morishita, T., Sato, K., Utsumi, M., and Kaneda, T. Prevalence of Infection and Phenotypes of GBV-C/HGV among Homosexual Men **Microbiol. Immunol.**, 47: 759-763 (2003)
- 5) Ibe, S., Shibata, N., Utsumi, M. and Kaneda, T. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6gag and P6pol Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy. **Microbiol. Immunol.**, 47: 71-79 (2003)

岡田 秀親 (分担研究者)

- 1) Otake, K., Omoto, S., Yamamoto, T., Okuyama, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Saksena, N. K., and Fujii, Y. R. HIV-1 Nef protein in the nucleus induces adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. **AIDS**, 18: 1-10 (2004)
- 2) Miura, Y., Kataoka, H., Asai, K., Tada, T., Nakanishi, M., Okada, N. and Okada, H. Susceptibility of killer T cells of gastric cancer cells enhanced by Mitomycin-C involves induction of ATF1 and activating of P21(Naf1/Cip1) promoter **Microbiol. Immunol.**, 48: in press (2004)
- 3) Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyu, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N. and Okada, H. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. **J. Immunol.** 170: 5764-5771 (2003)
- 4) Tani, S., Akatsu, H., Ishikawa, Y., Okada, N. and Okada, H. Preferential detection of procarboxypeptidase R by enzyme-lined immunosorbent assay. **Microbiol. Immunol.**, 47: 295-300 (2003)
- 5) Shimomura, Y., Kawamura, T., Komura, H., Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. **Microbiol. Immunol.**, 47: 241-245 (2003)

2. 学会発表

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予)

定を含む)

・特許第 3463143 号「糖鎖認識抗体及び HIV 感染症資料剤」(平成 15 年 8 月 22 日) 特許権者：岡田秀親；発明者：岡田秀親、岡田則子

・特願 2003-74316 (平成 15 年 3 月 25 日提出)「HIV 感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体及び HIV 感染症治療剤」出願人：岡田秀親、岡田則子；発明者：岡田秀親、岡田則子

・国際出願番号 PCT/JP03/08305 (2003 年 6 月 30 日) 同上

・特願 2003-74312 (平成 15 年 3 月 25 日提出)「活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト IgM 抗体」出願人：岡田秀親、岡田則子；発明者：岡田秀親、岡田則子

・国際出願番号 PCT/JP03/08306 (2003 年 6 月 30 日) 同上

・9F11 抗原の治療法への有用性に関する特許出願を準備中。



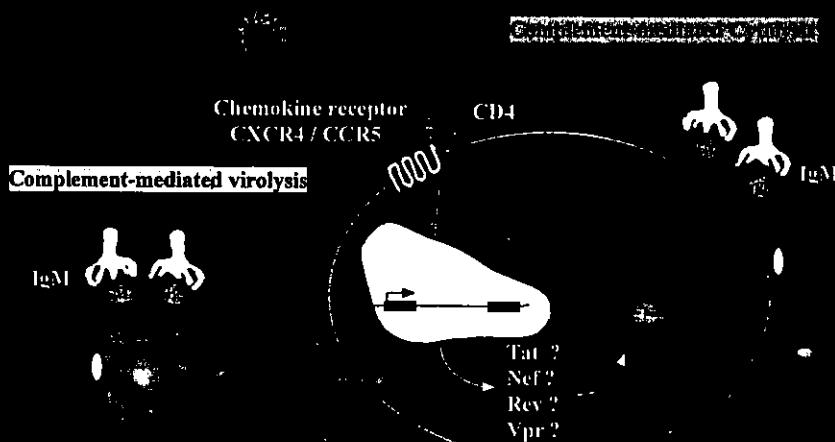
研究課題： HIV感染症の治療開発に関する研究

名古屋市立大学大学院医学研究科 岡田則子
国立名古屋病院臨床研究センター 金田次弘
福祉村病院長寿医学研究所 岡田秀親

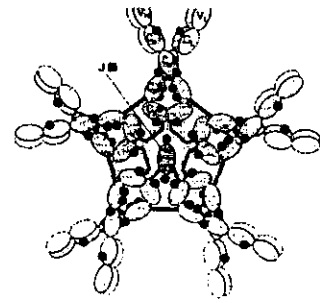
研究背景

GM2ガングリオシドなどに対するヒトIgM抗体が、HIV感染細胞に特異的に反応し、補体依存性の細胞死およびウイルス溶解を誘導して、抗HIV効果を発揮できることを検証した。

HIV-1-infected cell elimination via Complement activation



研究目的



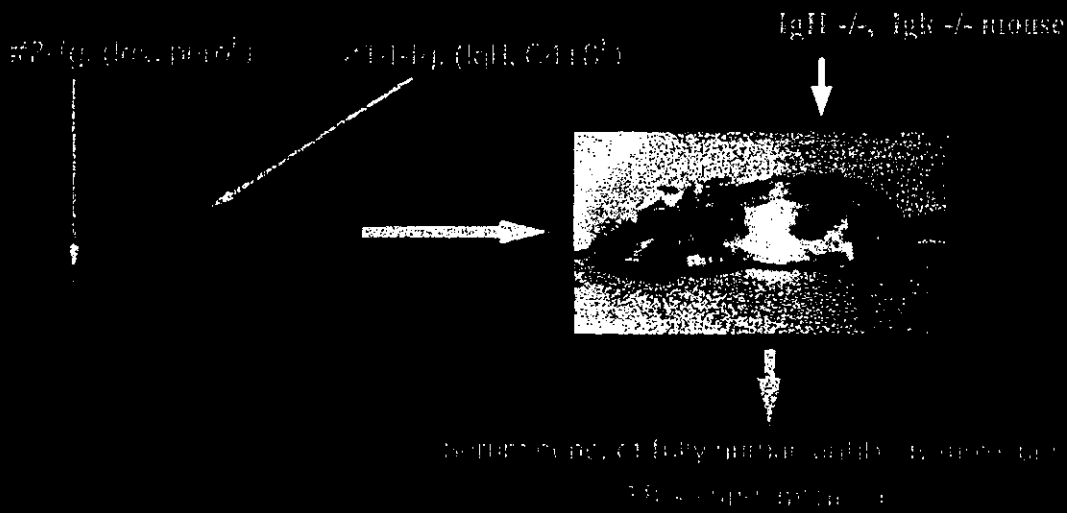
IgM抗体 初期感染防御抗体

- IgM抗体は強力な補体活性化能を有し、同種補体制御膜因子の機能をオーバーカムして細胞膜を破壊して、細胞死を引き起こす。
- IgM抗体は抗原をクロスリンクして、細胞内シグナル誘導によるアポトーシス細胞死を引き起こす場合がある。
- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を作成し、これらのIgM抗体により感染細胞死を誘導して排除することによる、HIV感染症の治療法を開発する。

研究実施課題

- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を産生する9F11, 2G9, CF8クローンを樹立した。
- 9F11抗体はHIV感染細胞に反応して補体依存性の細胞死を引き起こす。
- 2G9抗体はHIV感染細胞および潜伏感染細胞にも反応してアポトーシス誘導による細胞死を引き起こす。
- CF8抗体はNefに対する抗体であり、感染細胞に反応する。
- 9F11および2G9の反応する抗原分子を同定し、HIV感染症におけるこれらの抗原発現の意義を明確にする。
- Nefの細胞膜上での免疫標的としての意義を解明する。
- これらのヒトIgM抗体がHIV感染患者の血液中に含まれる感染細胞や、HAART成功例などでの潜伏感染細胞を排除することを立証し、HIV感染症の治療に有用であることを検証する。

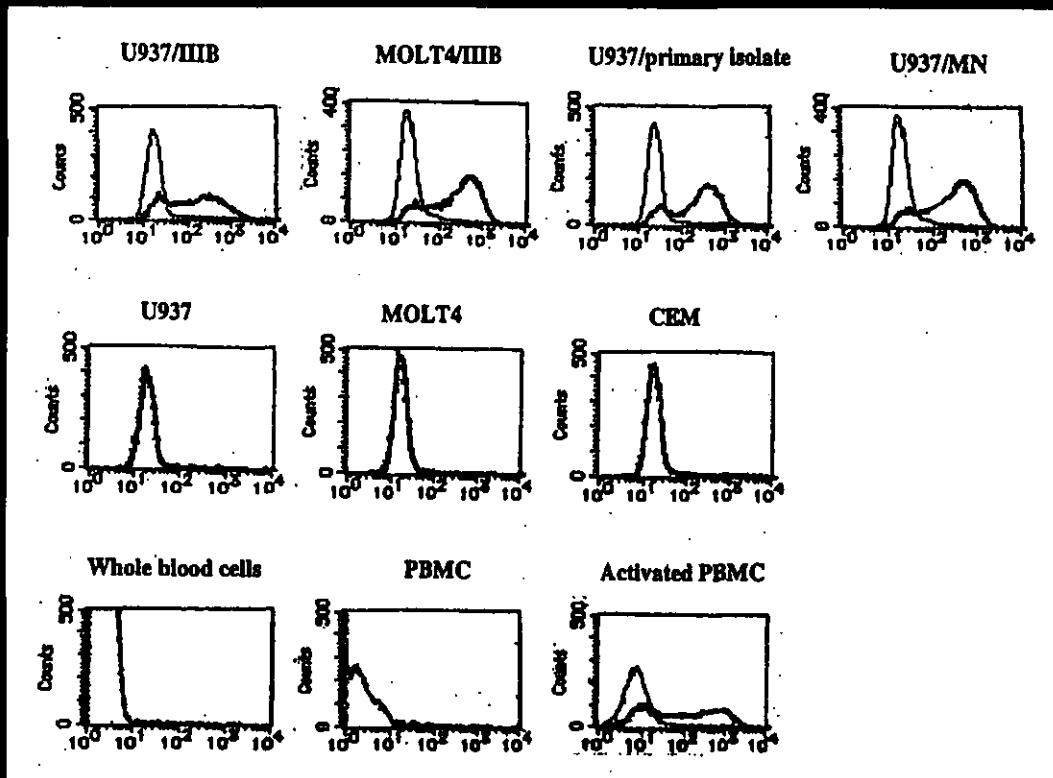
Production of human antibodies in Trans-Chromosome mouse (TC Mouse™) by Kirin Brewery Co.



TC-mouse contains all human Ig genes with Human V_H(S1), Human V_k (38 X 2)

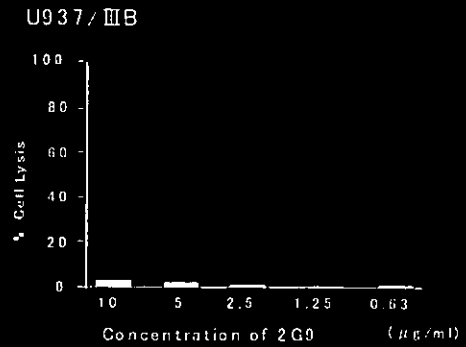
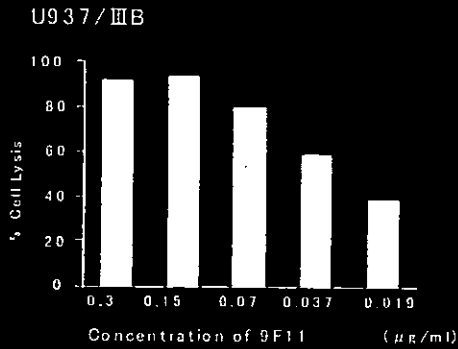
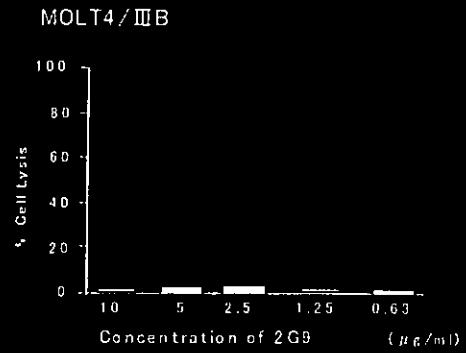
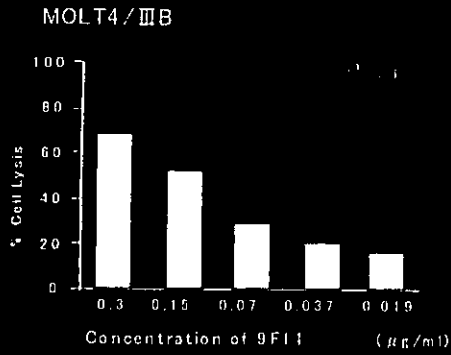
TC-mouse

Reactivity of 9F11 to HIV -infected and non-infected cells

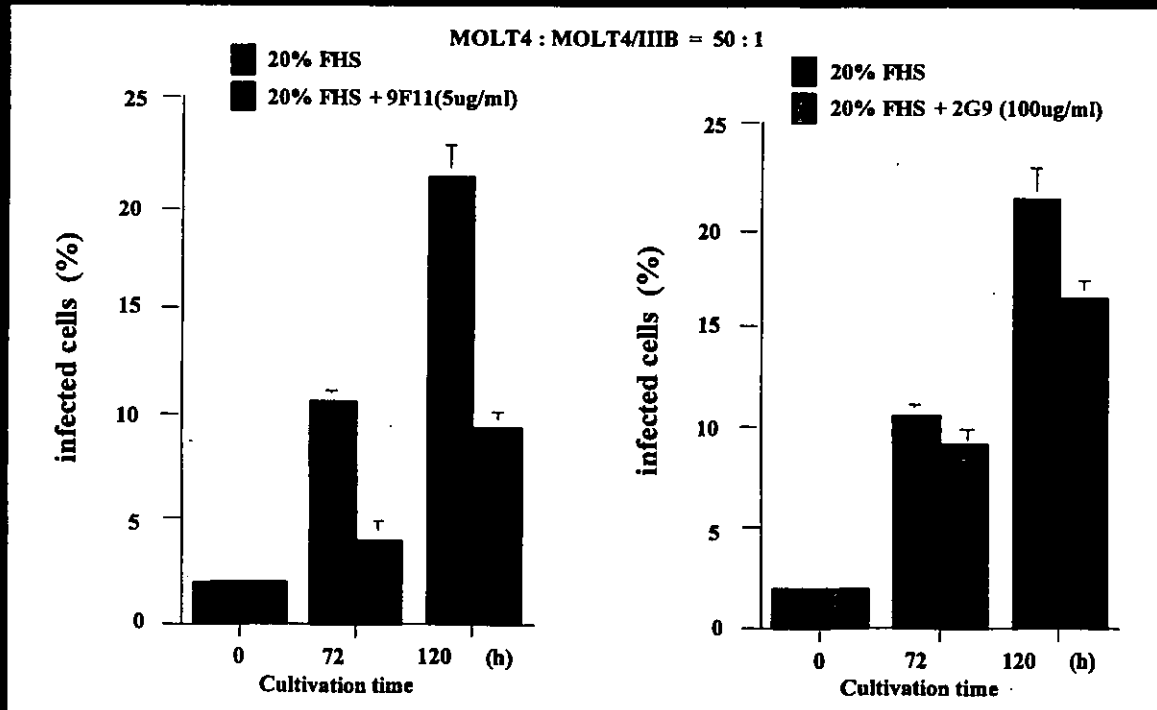


9F11

Complement-mediated Cytolysis

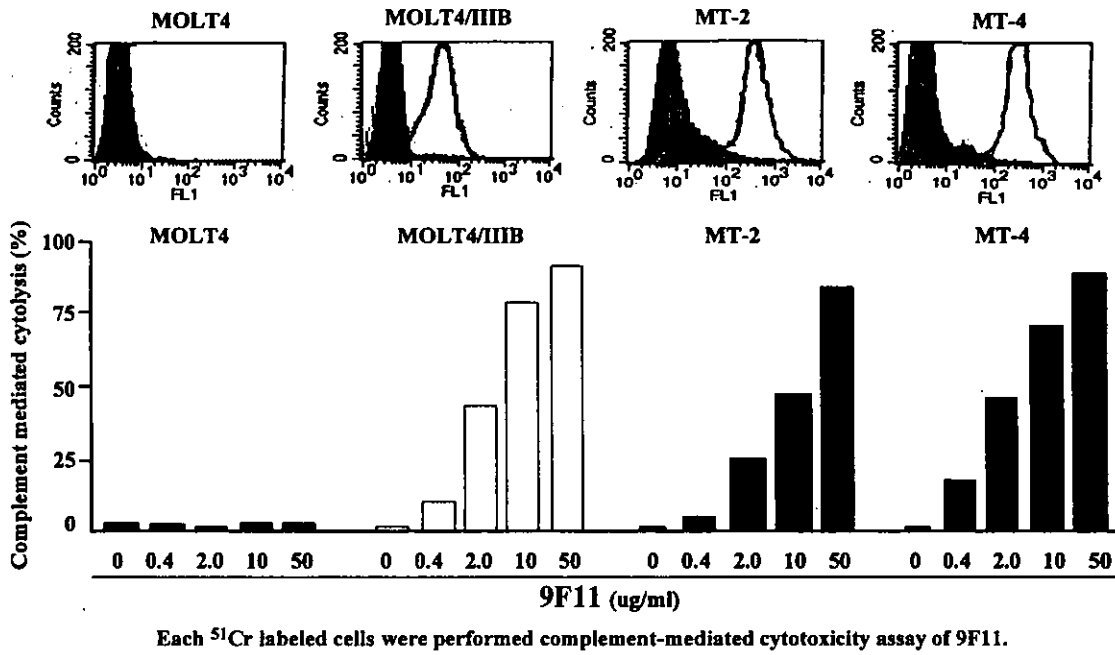


Effect of 9F11 or 2G9 on HIV-III B propagation in MOLT4 cells



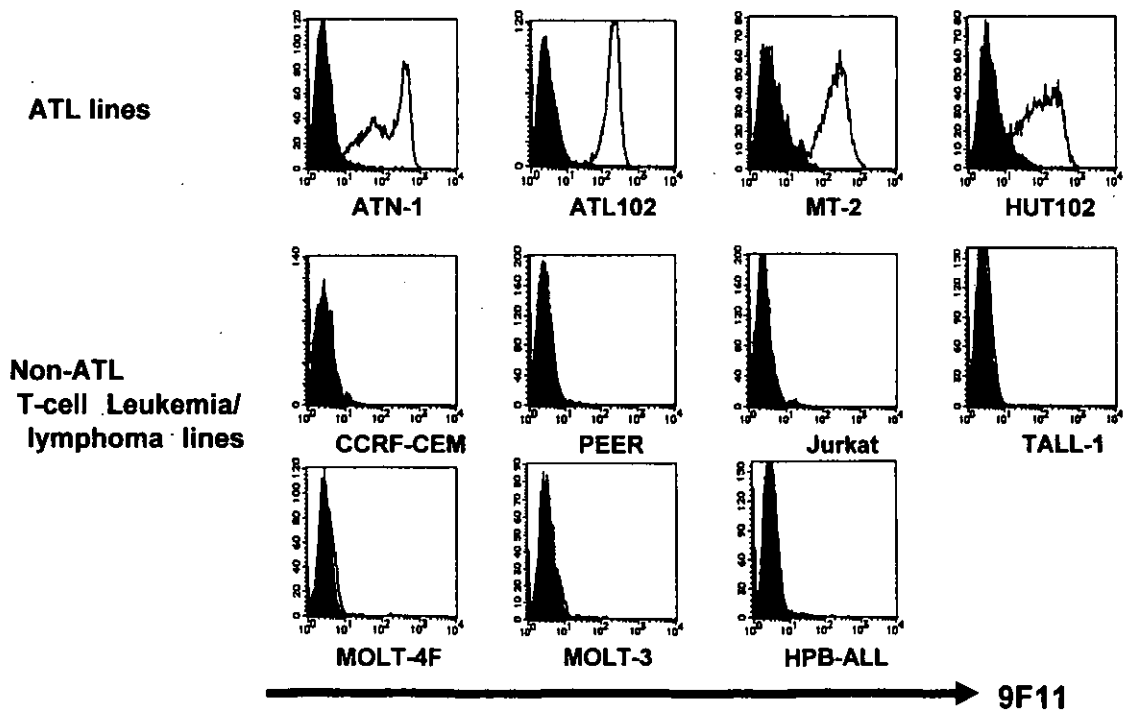
MOLT4/III B

9F11 Reactivity and Complement-mediated Cytolysis



9F11-ALL1

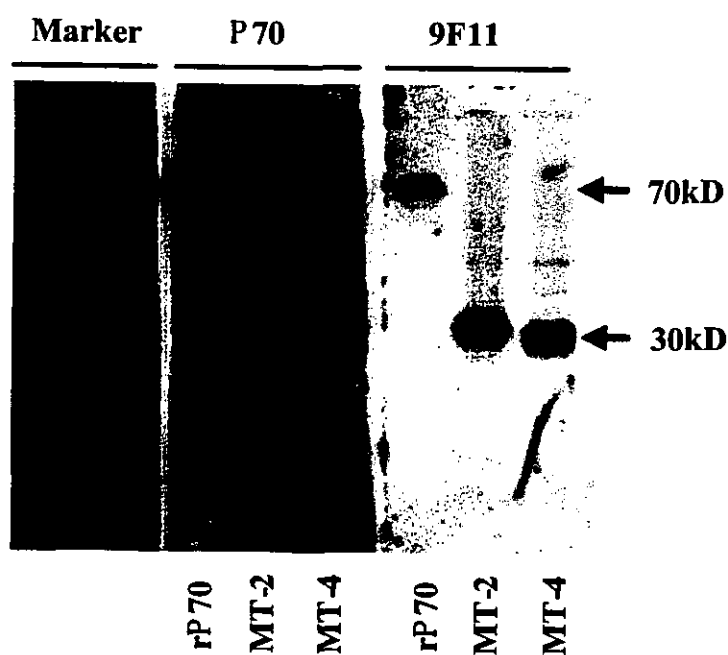
9F11 Antibody Specifically Reacted with ATL Cell Lines



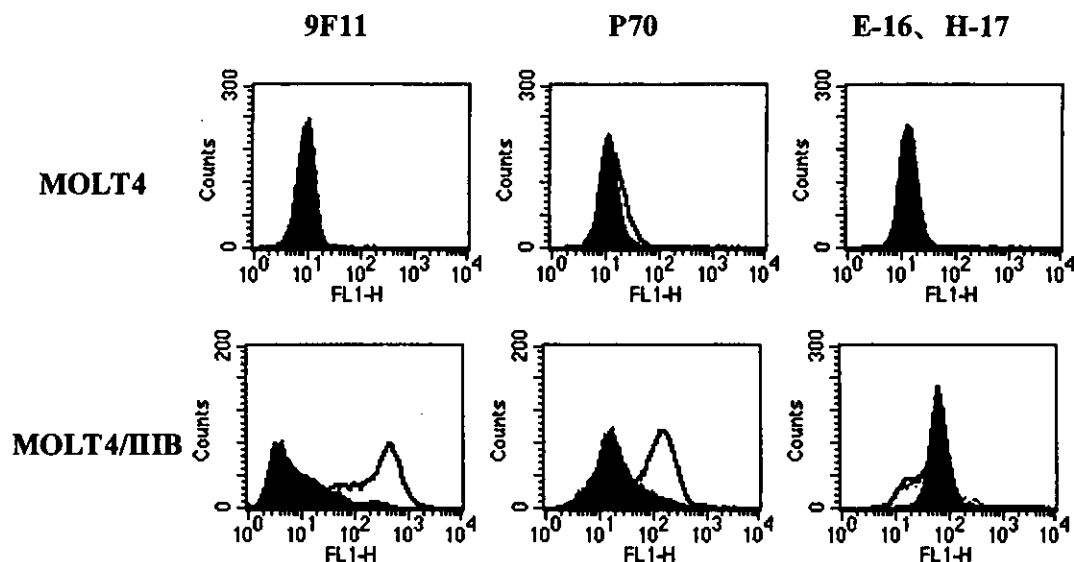
9F11抗原の同定

- 9F11が反応する抗原分子を特定するため、HIV感染細胞から作製したcDNAライブラリーを発現ベクターに組み込み、大腸菌等に導入発現させ、9F11抗体で9F11抗原のcDNAをスクリーニングした。
- 9F11と反応するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。
- 70kDaの細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されていた分子であるが、細胞膜表面上に現れることは知られていなかったのも、新たな発見である(分子名はP70と仮称)。
- HIV感染におけるP70分子の細胞膜上での表出の意義を明らかにする。

9F11 Antibody Reacted with Recombinant P70 Protein on Western Blot analysis



Rabbit polyclonal anti P70 antibody reacted with HIV-IIIB infected cells



E-16 and H-17 are rabbit peptide antibodies to N-region and internal region of P70.

考察

- 9F11抗原は、HIV感染により発現誘導されて細胞膜上に現れる分子であることがわかった。
- HTLV-I感染細胞でも同様に発現するので、レトロウイルス感染に共通する現象の可能性もある。
- 9F11と反応する抗原分子は70kDaのシグナル伝達に関わる分子が同定された。しかし、9F11が反応する細胞には、他に30kDaの抗原分子が検出され、その点に関する解析が急務と考えている。
- HIV感染患者末梢血リンパ球に対する解析は検出限界以下であり、容易でなかったため、来年度への継続課題として残った。
- HTLV-I感染細胞に9F11が反応して細胞溶解を起こすので、ATLに対する治療抗体としての活用も期待できる。
- 9F11などのヒトIgM抗体を大量に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え検討を開始した。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 潜伏感染細胞に対するヒト IgM モノクローナル抗体の研究
主任研究者 岡田 則子 名古屋市立大学大学院分子医学研究所 助
教授

研究要旨 ヒト IgM モノクローナル抗体 9F11 は HIV 感染細胞に反応して補体による細胞溶解を極めて効率よく起こすことができるので、その標的抗原（9F11 抗原）を明らかにするために遺伝子クローニングを行い、70kD の分子（P70 と仮称）を同定した。しかし、HIV 感染細胞成分を SDS-PAGE にかけて Western ブロットを行うと主要シグナルは 30 kD にあり、70 kD のシグナルは極めて弱い点については、詳細な解析が必要である。9F11 抗原は活性化 T リンパ球にも認められるが、調べた全ての HTLV-I 感染細胞株にも認められ、それ以外の白血病細胞株には認められなかった。HTLV-I 感染細胞株の 9F11 抗原も 30 kDa に強いシグナルを示した。未治療の患者末梢血の HIV 感染リンパ球には 9F11 と補体による処理で抑制されることを示唆する知見も得られたが、潜伏感染状態の感染細胞に 9F11 抗原を発現誘導させる方法は今後の課題である。Nef が潜伏状態に近い状況の感染細胞に発現している可能性が高いので、Nef に対するヒト IgM 抗体である CF8 をリクローニングして、解析に供するための準備も行った。

A. 研究目的

HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体（9F11 など）を作成することができた。これらのヒト抗体は HIV が感染した株化培養細胞に補体と共に働いて細胞障害を起こすことができる。そこで、これらのヒト抗体が HIV 感染患者の血液に含まれる感染細胞や潜伏感染細胞を障害除去できる可能性を検証する。また、Nef が慢性感染細胞の細胞膜上に発現していることを示す知見も得たので、Nef に対するヒト IgM 抗体（CF8 など）も同時に作用させたときの相乗効果も検討したい。9F11 が反応する抗原である 9F11 抗原を明らかにするため、その cDNA のクローニングを免疫スクリーニング法などを活用して行い、9F11 抗原の同定を試みる。一方、IgM1 抗体を患者に投与すれば、感染細胞などに反応

して強い補体活性化反応が起こることが想定される。そこで、補体反応に起因する過剰炎症反応による副作用の制御も想定して炎症抑制ペプチド剤の開発と応用も検討しておきたい。

B. 研究方法

9F11 が反応する抗原分子を特定する。HIV 感染細胞から作製した cDNA ライブラリーを発現ベクターに組み込み、大腸菌等に導入発現させ、9F11 抗原の cDNA を 9F11 抗体でスクリーニングする。また 9F11 抗体を感染細胞に反応させたあと、抗体と抗原をリンカーで化学結合させて抗原抗体複合物を抽出精製する。そこからリンカーを切断し、抗原分子の同定を行う。抗原分子の同定には、二次元電気泳動法も活用する。精製分離した抗原

やその断片のアミノ酸配列を解析して抗原分子の特定を行う。

HIV感染患者の末梢血リンパ球（必要に応じCD8陽性細胞は除去しておく）の初代培養に9F11等のヒトIgMモノクローナル抗体と新鮮ヒト血清を補体源として添加することによりHIVプロウイルスを保有した感染リンパ球を排除できる条件について検討を行う。プロウイルスの検出にはリアルタイムPCR法等を活用する。

Nefに対するヒトIgMモノクローナル抗体CF8を作成できた。しかし、CF8細胞株の抗体産生効率が充分でないので、リクローニングを行ってCF8抗体の産生効率をたかめる。その上で、CF8による潜伏感染細胞との反応性の解析を行う。

患者末梢血からHIV感染細胞をIgM抗体と補体結成等で排除する実験を実施するために、HIV感染細胞のHIV-RNAのRT-PCR、による検出や、P24による検出条件の基礎的検討を国立名古屋病院と協力して行う。

IgM抗体を大量に作製すると共に、抗体遺伝子をCHO細胞などに導入し、遺伝子組換え抗体の作製も試みる。IgM抗体を患者に投与して治療を行う場合には、過剰な補体反応による副作用の誘起も懸念される。そこで、過剰な補体反応による副作用に対処するため、C5a阻害ペプチド等を開発して、補体反応起因性の過剰炎症反応の制御に活用するための検討も行う。

（倫理面への配慮）

HIV 感染患者の末梢血を用いての解析に際しては、倫理委員会の承認のもとに、実験目的などを明確に説明して、書面による同意を得た上で実験を実施する。その際、得られた個人情報を守られるよう慎重に配慮する。

C. 研究結果

9F11 と反応する cDNA のスクリーニングにより、9F11 と反応するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。70 k Da の細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されていた分子であったが、細胞膜表面上に現れることは知られていなかったため、新たな発見である（分子名は特許申請に関わるので P70 と仮称する）。しかし、感染細胞抽出タンパク質の Western プロットでは 70 k Da のほかに 30 k Da に強いバンドが認められ、30 k Da の分子（70 k Da の分子断片の可能性もある）の同定が必要である。

9F11 は HIV 感染細胞以外に、HTLV-I 感染細胞である MT2 や MT4 細胞株にも強い反応性を示し、補体存在下でそれらの細胞も溶解した。HTLV-I 感染細胞にも上記 30 k Da タンパク質の強いシグナルが検出された。

HIV 感染患者末梢血リンパ球についての解析においては、倫理委員会の認可に手間取ったことと、初代培養リンパ球からの HIV-RNA の安定した検出定量法の確立が容易でなかったため、9F11 による抑制効果の確認は 1 症例のみに止まっている。CF8 細胞株のリクローニングは培養条件などで手間取っており、更なる改善を試みている。

C5a アナフィラトキシンを阻害する相補性ペプチドとしては、強力な阻害活性を示す 17 アミノ酸からなるペプチド剤 (ASGAPAPGPAGPLRPMF) を創生することができた。そのペプチドを Pep-A と命名したが、ラットのショック死モデルで救命効果も発揮できることを確認した。

D. 考察

9F11 抗原は HIV の遺伝子にコードされているのではなく、HIV 感染により発現誘導され、しかも細胞膜上に現れる分子であることがわかった。これは

HTLV-I でも同様な現象が起こることがわかったので、レトロウイルス感染に共通する現象の可能性もある。9F11 と反応する抗原分子は 70 k Da のシグナル伝達に関わる分子であるが、9F11 が反応する細胞には、30 k Da の抗原分子が検出され、その点に関する解析が急務と考えている。

HIV 感染患者末梢血リンパ球に対する解析は容易でなかったため、9F11 と補体血清の処理で患者末梢血中の HIV 感染細胞を抑制できることを示せたのは 1 症例のみであった。従って、来年度以降への継続課題として残った。また、HTLV-I 感染細胞に 9F11 が反応してヒト補体による細胞溶解を起こすので、ATL に対する治療抗体としての活用も期待できると考えている。

Nef に対する CF8 抗体については、有用性を示す知見を得るに至らなかった。十分な抗体量を用いて解析するために、CF8 産生のための工夫が必要である。生体内で起こりうる過剰補体反応による副作用の制御に活用できる C5a 阻害ペプチドの Pep-A を創生できたので、その改良と活用法を次年度以降に検討したい。一方、9F11 などのヒト IgM 抗体を大量に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え、検討を開始した。

E. 結論

9F11 抗原の遺伝子を同定できたことは、今後の展開に大きく貢献できる。また、HTLV-I 感染細胞にも 9F11 が反応することがわかったことも大きな成果と考えている。すなわち、HTLV-I 感染症患者への治療抗体として活用できる可能性があることは社会的意義も大きいと考えられる。しかし、感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対する有効性の確認は 1 症例に止まったので、次年度以降に症例を重ねての検討が必要であ

る。

F. 健康危険情報

正常の活性化 T リンパ球にも 9F11 抗原が発現誘導されるものがあることがわかったので、それらの正常細胞に対する反応による副作用の可能性についての検討を慎重に行う必要がある。逆に、過剰に活性化した T リンパ球を抑制できるのであれば、自己免疫疾患や移植拒絶反応での緊急の免疫抑制剤として 9F11 を活用できる可能性もある。なお、生体内で、HIV 感染細胞に対して強力な補体反応が起こることによる急性炎症反応に属する副作用の可能性についても慎重に検討する必要がある。それに対処する手段の一つとして、C5a 阻害ペプチド剤を創生できたことは、有用な対策手段の一つとなると期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otake, K., Omoto, S., Yamamoto, T., Okuyama, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Saksena, N. K., and Fujii, Y. R. HIV-1 Nef protein in the nucleus induces adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS*, 18: 1-10 (2004)
- 2) Ohi, H., Tamano, M., Sudo, S., and Okada, N. Recombinant EPO therapy increases erythrocyte expression of complement regulatory proteins. *Am. J. Kidney Dis.*, 41: 179-85 (2003)
- 3) Shimomura, Y., Komura, H., Campbell, W., Okada, N., and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomodulin. *Microbiol. Immunol.*, 47: 241-245, (2003)
- 4) Kawai M., He, L., Kawamura, T., Omoto, S., Fujii, Y. R., and Okada, N. Chimeric human/murine monoclonal IgM antibodies to HIV-1 Nef antigen expressed on chronically infected cells.

- Microbiol. Immunol.**, 47: 247-253 (2003)
- 5) Tani, S., Akatsu, H., Ishikawa, Y., Okada, N., and Okada, H. Preferential detection of procarboxypeptidase R by enzyme-linked immunosorbent assay. **Microbiol. Immunol.**, 47: 295-300 (2003)
 - 6) Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyi, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N., and Okada, H. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. **J. Immunol.**, 170: 5764-5771 (2003)
 - 7) Ahmad, S. R., Lindington, E. A., Ohta, R., Okada, N., Robson, M. G., Davis, K. A., Leiyges, D. M., Harris, C. L., Haskard, D. O., and Mason, J. Decay-accelerating factor induction by TNF α through a phosphatidylinositol-3 kinase and protein kinase C-dependent pathway, protects murine vascular endothelial cells against complement deposition. **Immunology**, 110: 258-268 (2003)
 - 8) Yoshioka, Y., Suzuki, R., Okamoto, T., Okada, N., Mukai, Y., Dshibuta, H., Tsutsumi, Y., Dohi, N., Okada, N., Nakagawa, S., and Mayumi, T. Combination effects of complement regulatory proteins and anti-complement polymer. **B. B. A.**, 1624: 54-59 (2003)
 - 9) Brisible, E. A., Okada, N., Mizukami, H., Okuyama, H., and Fujii, Y. R. RNA interference: Its potentials for the prevention of HIV infections and the challenges ahead. **Trends in Biotech.**, 21: 306-311 (2003)
 - 10) 岡田則子 AIDS に対する抗体療法 **Mol. Med.** 40: 1226-1231(2003)
 - 11) 岡田則子 IgM 抗体と HIV 感染防御 感染・炎症・免疫 33: 256-263 (2003)
- 2.学会発表
- 1) HIV-1 感染細胞に細胞死を誘導するヒト IgM モノクローナル抗体の解析 金原紀章、土肥名月、朝井鈴佳、Yin, S., 岡田則子、岡田秀親 第40回補体シンポジウム抄録集 40:59-60 (2003) 8/22-23 熊本
 - 2) HIV 慢性感染細胞を認識してアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体 土肥名月、Yin, S., 飛沢笑山、岡田秀親、岡田則子 第33回日本免疫学会総会抄録集 33: 296(2003)12/8-10 福岡
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- ・特許第 3463143 号「糖鎖認識抗体及び HIV 感染症資料剤」(平成 15 年 8 月 22 日) 特許権者: 岡田秀親; 発明者: 岡田秀親、岡田則子
 - ・特願 2003-74316 (平成 15 年 3 月 25 日提出) 「HIV 感染細胞にアポトーシスを誘導するヒト IgM 抗体及び HIV 感染症治療剤」出願人: 岡田秀親、岡田則子; 発明者: 岡田秀親、岡田則子
 - ・国際出願番号 PCT/JP03/08305 (2003 年 6 月 30 日) 同上
 - ・特願 2003-74312 (平成 15 年 3 月 25 日提出) 「活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト IgM 抗体」出願人: 岡田秀親、岡田則子; 発明者: 岡田秀親、岡田則子
 - ・国際出願番号 PCT/JP03/08306 (2003 年 6 月 30 日) 同上
 - ・9F11 抗原の治療法への有用性に関する特許出願を準備中。

HIV-1感染細胞に細胞死を誘導するヒトIgMモノクローナル抗体の解析

名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学

金原紀章 土肥名月 朝井鈴佳 尹淑萍 岡田秀親 岡田則子

Complement-dependent cytotoxicity of HIV-infected cell by human serum

