

200400643A

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16年度総括研究報告書

主任研究者 岡田則子

平成17年4月

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 岡田則子

平成17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16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	17
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	33
金田次弘	
(資料)患者末梢血 CD4 陽性細胞における 9F11 抗原発現の 解析に関する研究発表	
3. HIV 感染患者からの LAK-T リンパ球に関する研究	39
岡田秀親	
(資料)活性化自己リンパ球投与による CD8 リンパ球の発現率と 治療効果	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物 別刷	51

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医学研究科 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 9F11 は極めて効率よく感染細胞を破壊する。その標的抗原の遺伝子クローニングを行い、P70 を同定した。しかし、HIV 感染細胞では 30kD と反応するので affinity 精製を行い、抗原の N-末端アミノ酸解析を行った結果、データベース登録の範囲では決定されなかった。HIV 感染患者末梢血の解析により 9F11 抗原陽性細胞の上昇が認められ CD4 カウントと逆相関を認めた。さらに、HIV 感染患者血液から分離したリンパ球分画にヒト IgM 抗体 9F11 を新鮮ヒト血清補体との共存下に初代培養を行い上清中の P24 を定量する解析で、高い抗ウイルス活性を示し、HIV 感染をほぼ完全に排除できる例も認められ、IgM 抗体の有用性が示された。

分担研究者:金田 次弘(国立病院機構
名古屋医療センター血液免疫研究部
部長)

分担研究者: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 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する。患者リンパ球から潜伏感染細胞を除去できれば、抗 CD3 抗体と IL-2 で刺激増殖させた LAK-T リンパ球を治療に応用する為の基礎的知見も集積する。補体反応に起因する過剰炎症副作用の制御も想定して炎症抑制ペプチド剤の応用も検討しておきたい。

B. 研究方法

9F11で抗体スクリーニングでクローニングしたcDNAは70kDの蛋白質をコードするもので30kDaのものではなかった。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、抗原分子の同定を試みた。抗原分子の同

定には、二次元電気泳動法も活用した。精製分離した抗原やの断片のアミノ酸配列を解析して抗原分子の特定を試みた。

HIV感染患者末梢血CD4陽性細胞での9F11抗原の分布と発現の有無を蛍光抗体染色法で解析した。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試みた。感染細胞の抑制はP24のELISA定量や、HIV遺伝子のリアルタイムPCR法で解析した。HAARTなどの化学療法を受けている患者や未治療の患者の末梢血リンパ球についての比較解析も試みた。

Nefに対するヒトIgMモノクローナル抗体CF8を用いて、潜伏感染細胞の検出と排除を試みた。患者末梢血やリンパ節等の潜伏感染細胞等でのNefの発現をフローサイトメトリー法や免疫組織染色法等も用いて解析した。

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た。また、過剰な補体反応による副作用に対処するため、C5a阻害ペプチドを開発し、その活用法についての検討も行った。

(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、(独)国立病院機構名古屋医療センター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した。その際、得られた個人情報を守られるよう慎重に配慮している。

C 研究結果

9F11を精製し、N末10個のアミノ酸配列を解析した。その配列はデータベースにはみつからず、新規なタンパク質と考えられた。

HIV感染患者末梢血に9F11抗原陽性細胞が認められた。HIV感染患者血液から分離したリンパ球分画にヒトIgM抗体9F11を新鮮ヒト血清補体と共に加えて初代培養を行い上清中のP24を定量する解析で、HIV感染細胞をほぼ完全に排除できた症例が多かったが、抵抗性の症例も認めた。HIV感染患者CD4陽性細胞における9F11抗原陽性率は4~29%(平均12%)の分布を示した。9F11抗原陽性率はCD4リンパ球数との逆相関を認めた。

SHIVやSIVを感染させたサル末梢血にも9F11抗原陽性細胞が出現することが分かった。そこで、SIV感染サルに9F11を投与する予備的実験を開始した。最初のサルでは9F11をゆっく静脈内に投与したためか、免疫複合体形成によると考えられる症状は全く認められなかったが、2頭めでは短時間で投与したためか、ショック症状を呈して死亡した。3頭めは軽度のショック症状が認められた。

ショック症状を制御するために、C5aアナフィラトキシンを強力に制御できるペプチド剤(AcPepA)を開発した。サルに

LPS 投与でショックを起こさせ血圧が測定不能状況になってから AcPepA を 2mg/kg 投与すると速やかに回復することが分かった。

D 考察

9F11 抗原を精製し、その N 末10個のアミノ酸配列を決定したがデータベースには見つからない配列であった。再度精製を行い、配列の確認を行ったうえで、その配列を基にプライマーを設計して PCR 法での遺伝子クローニングが必要である。

患者末梢血の感染細胞を 9F11 と補体血清の処理で多くの場合感染細胞を激減できたので治療への応用が期待できる。また、HIV 感染患者 CD4 細胞において 9F11 抗原の発現が誘導増幅されると考えられる。

生体内で起こりうる過剰補体反応を避けるためには静脈内投与よりも皮下投与や腹腔内投与を検討する必要がある。C5a 阻害ペプチド剤などを 9F11 と混合して投与することも検討したい。

E 結論

IgM 抗体が有用である可能性が高まった。感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対する有効性が認められたことは心強い。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義については、IgM 抗体治療の有用性高まり、社会的意義も大きい成果と考えている。今後の展望についてはトランスレーショナルリサーチも視野に入れて研究を展開したい。

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。

G 研究発表

論文発表

岡田 則子(主任研究者)

- 1 Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kimbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X., and Okada, H. Human IgM monoclonal antibodies reactive with HIV-1 infected cells generated using a Trans-Chromosome mouse. 2005 submitted
- 2 岡田則子 HIV 感染症治療における IgM 抗体療法の可能性 Medical Tribune 感染症版 2005 in press
- 3 Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kinbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X. and Okada, H. Human IgM mAbs reactive with HIV-infected cells generated using a trans-chromosome mouse. *Molecular Immunology* 41: 288-289, 2004
- 4 Hosokawa, M., Imai, M., Okada, H. and Okada, N. Inhibition of HIV-1 infection in cells expressing an artificial complementary peptide. *BBRC* 2004 324: 236-240
- 5 Fujii, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Uayashi, H., Okada, H.,

- Okada, N., Kawai, M., Okuyama, H., and Imakawa, K. A potential live vector, Foamy virus, directed intra-cellular expression of ovine interferon-tau exhibited the resistance to HIV infection. *JVMS*, 66: 115-121, 2004
- 6 Imai, M., Ohta, R., Okada, N. and Tomlinson, S. Therapeutic inhibition of a complement regulator enhances antibody therapy in a model of mammary adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 110: 875-881, 2004
- 7 Fujita, E., Farcus, I., Campbell, W., Baranyi, L., Okada, H and Okada, N. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region of C5a. *J. Immunol*, 172: 6382-6387, 2004
- 8 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)
- 9 Ohta, R., Kondor, N., Dohi, N., Tomlinson, S., Imai, M., Holers, VM., Okada H., and Okada, N. Mouse Crry/65 neutralized tumor vaccine induces antitumor activity in vivo. *J Immunol*. 2004, 173(1):205-13.
- 10 Gelderman KA, Kuppen PJ, Okada N, Fleuren GJ, Gorter A. Tumor-specific inhibition of membrane-bound complement regulatory protein Crry with bispecific monoclonal antibodies prevents tumor outgrowth in a rat colorectal cancer lung metastases model. *Cancer Res*. 2004 Jun 15;64(12):4366-72.
- 11 Asai, S., Sato, T., Tada, T., Miyamoto, T., Kimbara, N., Motoyama, N., Okada, H and Okada, N. Absence of ProCarboxypeptidase R induces Complement-mediated lethal inflammation in LPS-primed mice. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4669-74.
- 12 Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., Akinaga, S., Takahashi, T, Utsunomiya, A., Ueda, R. The CC chemokine receptor 4 (CCR4) as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004 10: 7529-39
- 13 Joh, T., Sasaki, M., Kataoka, H., Tanida, S., Itoh, K., Kondo, Y., Ogasawara, N., Oshima, T., Okada, N., Ohara, H., Nomura, T., and Itoh, M. Helicobacter pylori eradication decreases the expression of GPI-anchored complement regulators, DAF and HRF20 in human gastric epithelium. *J. Gastroenterology and Hepatology* in press
- 14 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)
- 15 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)
- 16 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)
- 17 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)
- 18 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)
- 19 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)
- 20 岡田則子 AIDS に対する抗体療法 *Mol. Med.* 40: 1226–1231 (2003)
- 21 岡田則子 IgM 抗体と HIV 感染防御 感染・炎症・免疫 33: 256–263 (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 Okada, H., Fujita, E., Farkas, I., Campbell, W. and Okada, N. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region C5a. *Molecular Immunology* 41: 288, 2004
- 2 Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kimbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X., and Okada, H. Human IgM monoclonal antibodies reactive with HIV-1 infected cells generated using a Trans-Chromosome mouse. 2005 submitted
- 3 Fujita, E., Farcus, I., Campbell, W., Baranyi, L., Okada, H and Okada, N. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region of C5a. *J. Immunol.*, 172: 6382-6387, 2004
- 4 Hosokawa, M., Imai, M., Okada, H. and Okada, N. Inhibition of HIV-1 infection in cells expressing an artificial complementary peptide. *BBRC* 324: 236-240, 2004

- 5 Fujii, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Uayashi, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Okuyama, H., and Imakawa, K. A potential live vector, Foamy virus, directed intra-cellular expression of ovine interferon-tau exhibited the resistance to HIV infection. *JVMS*, 66: 115-121, 2004
- 6 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)
- 7 Ohta, R., Kondor, N., Dohi, N., Tomlinson, S., Imai, M., Holers, VM., Okada H., and Okada, N. Mouse Crry/65 neutralized tumor vaccine induces antitumor activity in vivo. *J Immunol.* 173(1):205-13, 2004
- 8 Asai, S., Sato, T., Tada, T., Miyamoto, T., Kimbara, N., Motoyama, N., Okada, H and Okada, N. Absence of ProCarboxypeptidase R induces Complement-mediated lethal inflammation in LPS-primed mice. *J Immunol.* 173(7):4669-74, 2004
- 9 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
- 10 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
- 11 Shimomura, Y., Kawamura, T., Komura, H., Campbell, W., Okada, N. and Okada, H. Modulation of procarboxypeptidase R (proCPR) activation by complementary peptides to thrombomoduline. *Microbiol. Immunol.*, 47: 241-245, 2003

B.

C. 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

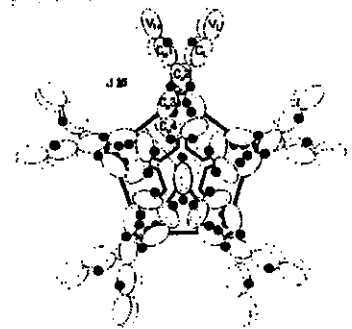
・国際出願番号 PCT/JP03/08306(2003年6月30日)同上



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10価であり、Avidityが高い。また、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。

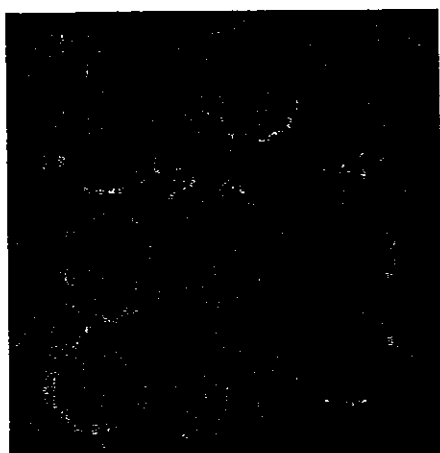
研究実施課題

- 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。

9F11-MOLT4IIIB細胞

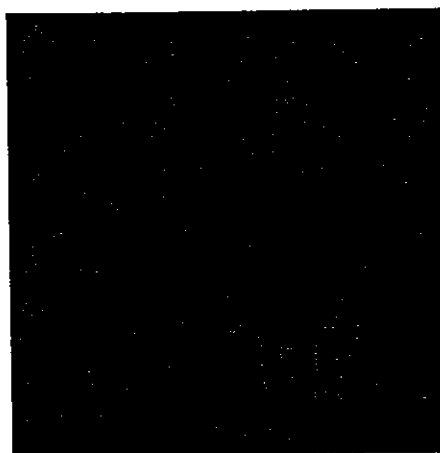
持続感染細胞MOLT4-III B細胞における9F11抗原の発現

MOLT4-III B



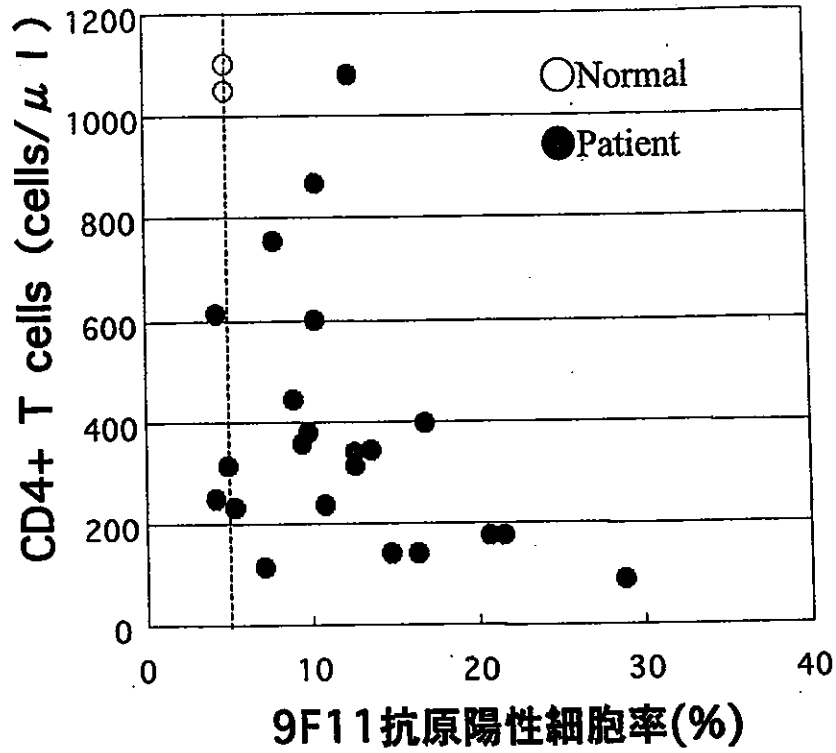
100% (+)

MOLT4

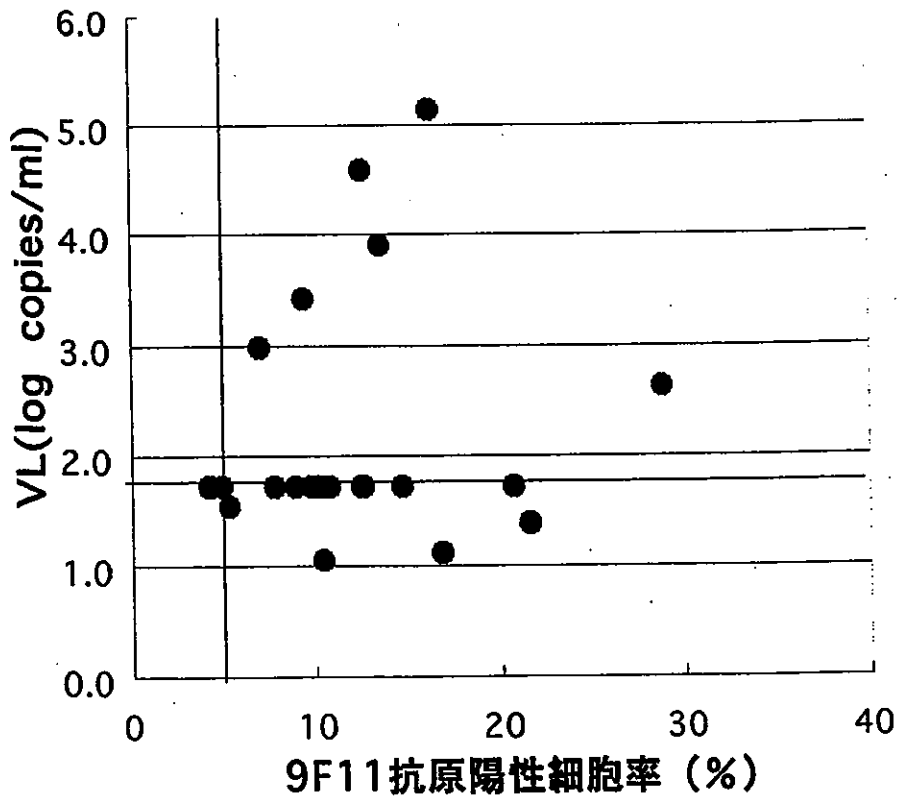


100% (-)

9F11抗原陽性細胞率とCD4陽性Tリンパ球数

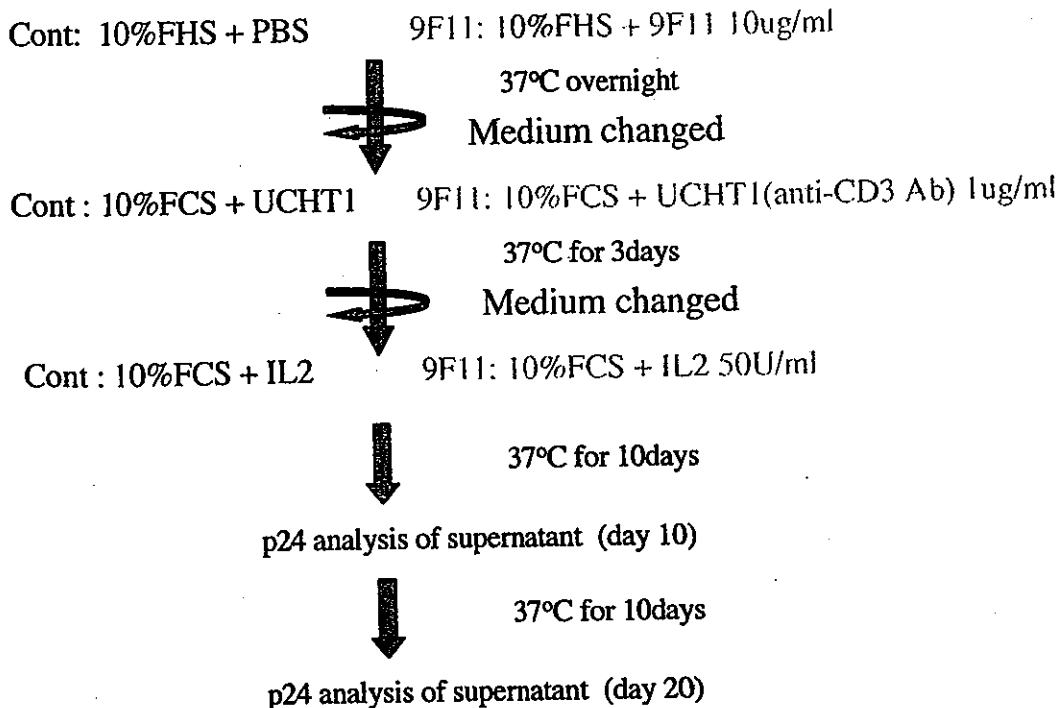


9F11抗原陽性細胞率と血中ウィルス量



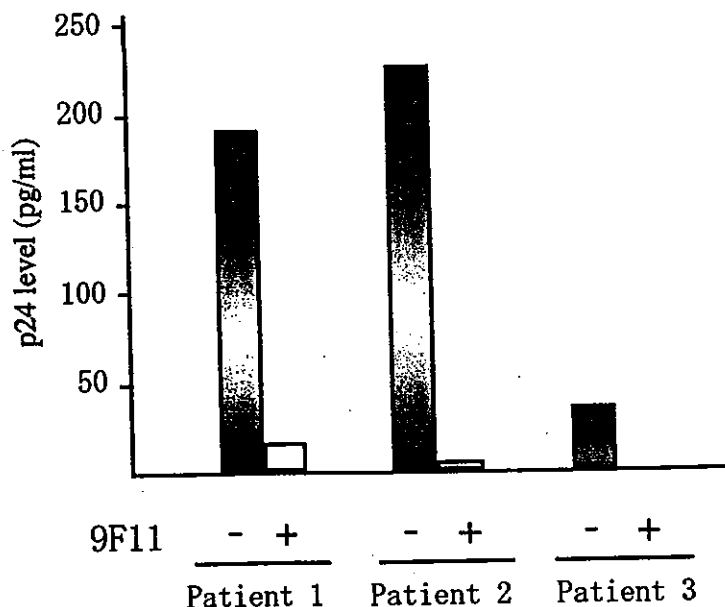
Experimental Protocol for detection of anti-HIV effect of 9F11 ex vivo

(CD4 cells from patients blood were prepared using StemSep system)



9F11抑制効果

9F11 supresses HIV-1 propagation in Patients CD4 cells ex vivo



Patients CD4 cells were treated with 10%FSH with or without 9F11 for 1 day and washed out with medium. Then patient 1 and 2 were cultivated for 10 days and patient 3 was for 20 days.

Effect of 9F11 against HIV propagation of Patients CD4 cells ex vivo

Patient No.	Cultivation Time	p24 level (pg/ml)		
		Control	9F11	AZT
Patient 1	10 day	181.4	22.3	ND*
	20 day	208.1	194.6	14.2
Patient 2	10 day	220.8	3.5	208.2
	20 day	236.8	236.4	228.8
Patient 3	10 day	5.7	ND	ND
	20 day	38.4	ND	ND

Patients CD4 cells were treated with 10%FHS with or without 9F11 for 24 hrs, and washed. Then these were cultivated with anti-CD3 and IL2. The supernatants were analysed at 10 and 20 days. 1 uM AZT treatment were performed throughout during 10 and 20 days cultivation.

*ND; not detected

9F11効果まとめ

HIV感染者末梢血リンパ球ex vivo培養による9F11抗体の抗HIV効果

9F11(10 ug/ml)を補体存在下にリンパ球と一晩反応後、メディウム交換にて抗体を除去し、抗CD3抗体添加刺激によるHIVウィルスの叩き出し培養を行った。
末梢血検体 38例中リンパ球培養できた23例のうち、ウィルス検出可が6例であった。

Patient No	Cultivation day	P24 (pg/ml)		%inhibition
		10%FHS alone	10%FHS +9F11	
1	10	2582.5	0	100
2	10	445.9	0	100
3	20	38.4	0	100
4*	20	5.1	0	100
5	10	4301.2	3.5	99.92
6	10	750.8	22.3	97.02

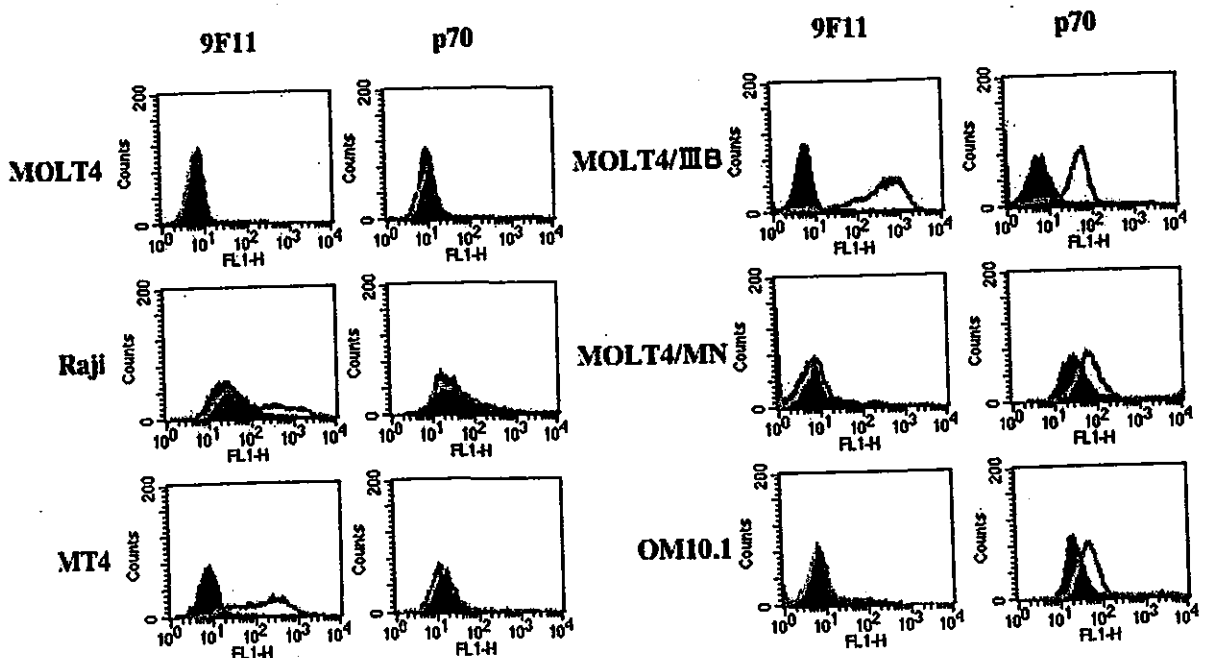
* HAART成功例患者(RNA コピー数<50)である。P24測定の信頼限界は~5 pg/mlである。

9F11抗原の同定

- HIV感染細胞からcDNAライブラリーを作製して、9F11抗原のcDNAをスクリーニングした。その結果、9F11と反応するタンパク質P70(仮称)をコードする遺伝子を同定した。
- P70は細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されている分子であるが、細胞膜表面に発現誘導されることは報告されていない。
- HIV感染におけるP70分子の細胞膜上への表出の意義を明らかにする。
- 9F11抗体は感染細胞膜上の30kDの分子を認識する。
- 細胞膜より抗原のアフィニティー精製を行い、N末端アミノ酸配列を決定した。
- P70と30kD分子は異なる分子である可能性が示唆された。

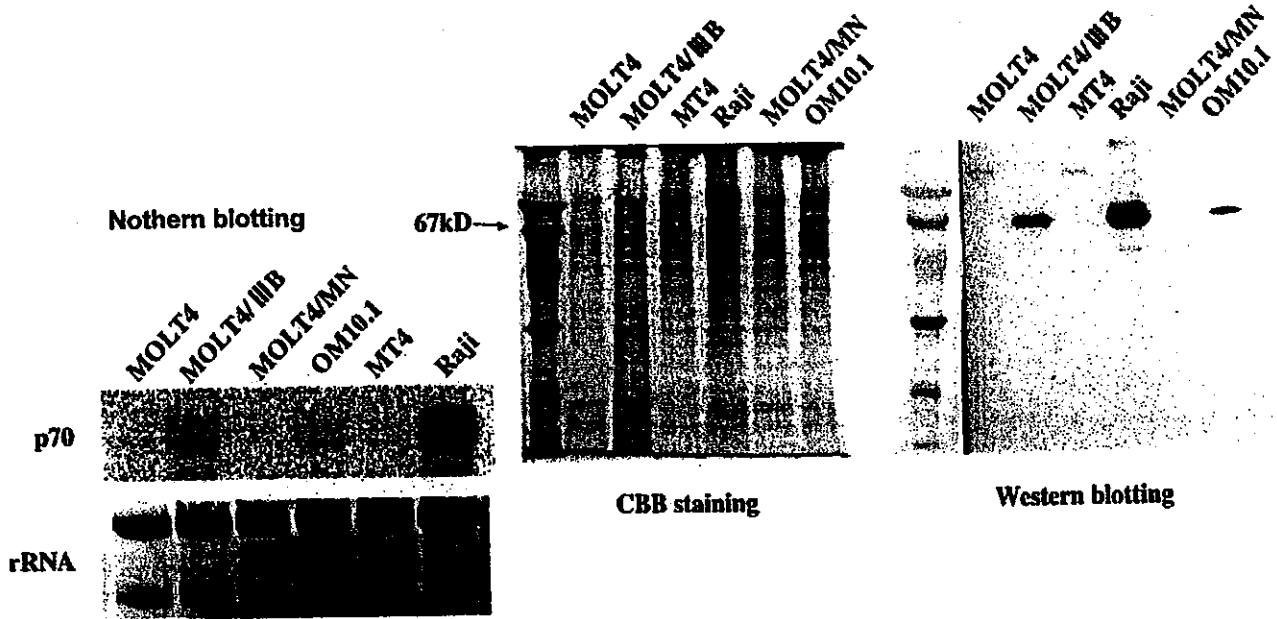
P70-FACS

Polyclonal anti-P70 Ab reacted with HIV-infected cells

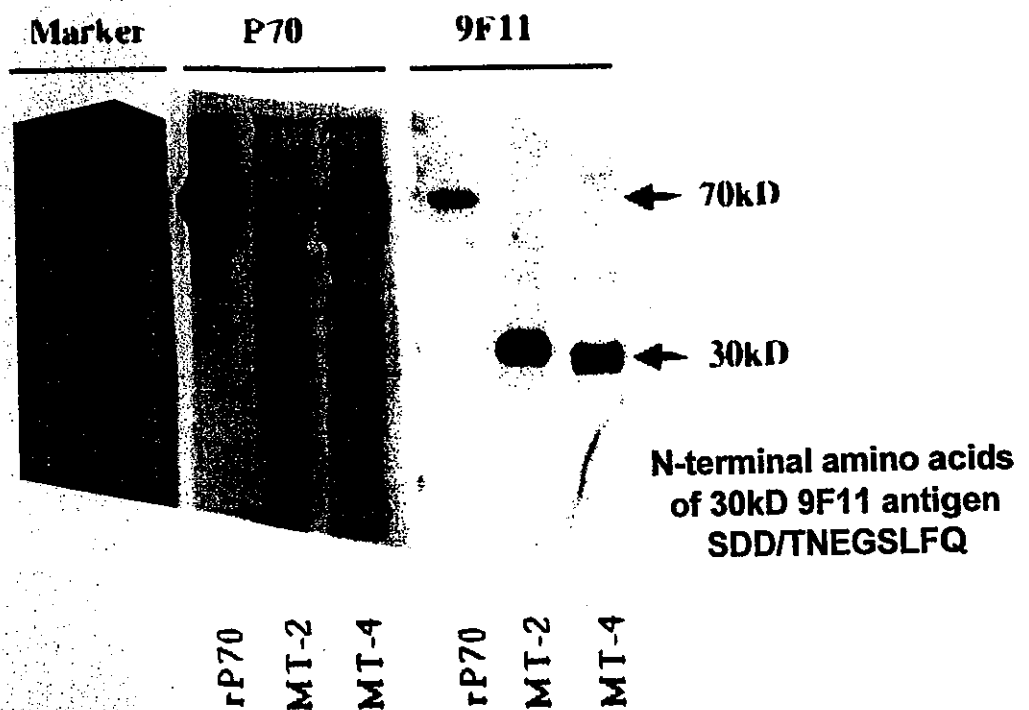


Expression of P70 in HIV-infected cells

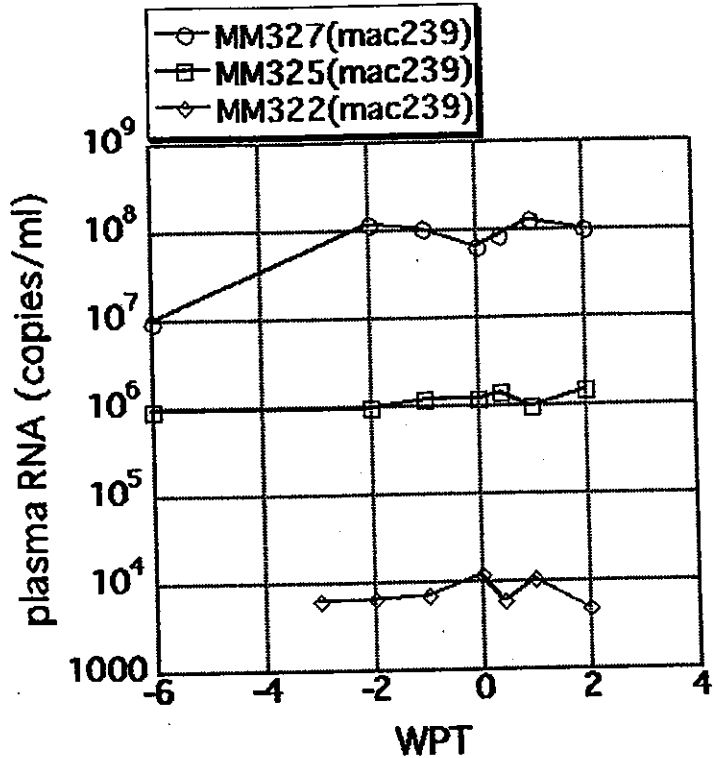
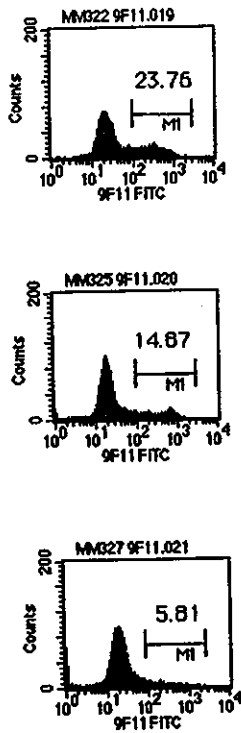
Nothern and Western blot analysis



9F11 Antibody Reacted with Recombinant P70 Protein and 30kD Protein on Western Blot analysis



Reactivity of 9F11 to PBMC from SIV infected Monkey



結語

- 9F11はHIV感染細胞に反応して1 ug/ml以下で補体依存性細胞傷害を引き起こし、抗HIV活性を示すヒトIgMモノクローナル抗体である。
- 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70kDおよび30kDの蛋白である。
- 9F11はHTLV-I感染細胞に反応して細胞溶解を起こすので、HIV感染症のみならずATLに対する治療抗体としての活用も期待できる。
- 9F11はHIV感染者末梢血CD4細胞に反応し、CD4細胞数の低下に伴いその反応性は上昇傾向を示した。
- HIV感染者末梢血CD4細胞を用いた、ex vivoでの抗HIV効果の検討をp24量を指標に行った結果、ウィルス検出が可能であった6例全てで、抑制率97%以上の高い抗ウィルス活性が検出された。

9F11はサルSIV感染細胞にも反応性を示すので、9F11の抗HIV効果とその安全性をSIV/SHIV感染サルを用いて検討することが可能である。
9F11抗原決定を完了すると共に、臨床応用へ向けた解析を進める。

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

分担研究者 岡田 則子 名古屋市立大学大学院分子医学研究所 助教授
共同研究者 金田次弘(国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター)
共同研究者 永井裕美(国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター)
共同研究者 服部道子(国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター)
共同研究者 土肥名月(名古屋市立大学大学院分子医学研究所)
共同研究者 河村剛至(名古屋市立大学大学院分子医学研究所)

研究概要

ヒト IgM モノクローナル抗体 9F11 は実験室株である III B や MN 株などの 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。そこで、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)を同定したが、HIV 感染細胞成分を SDS-PAGE につけて Western ブロットを行うと主要シグナルは 30 kD にあったので、この p70 分子と 30kD 分子の解析を行った。HIV 感染者末梢血の CD4 陽性細胞を用いて 9F11 抗体の抗 HIV 活性を検討した結果、培養 10 日および 20 日後の培養上清中の p24 量解析により高い抗 HIV 活性が検出された。AZT に無反応性の臨床材料においても効果が確認された。さらに、9F11 反応性が SIV 感染サル末梢血において確認されたので、SIV サル実験モデルにおいての *ex vivo* および *in vivo* での基礎的検討を開始した。また、HIV 潜伏感染細胞に反応する抗 Nef ヒト IgM モノクローナル抗体 CF8 を樹立し、抗体反応エピトープの解析を行った。

A. 研究目的

HIV 感染細胞に特異的反応するヒト IgM モノクローナル抗体 (9F11 など) を樹立作成した。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ているので、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、IgM 抗体を患者に投与すれば、感染細胞な