

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することが必要と考えられる。サルのSIV/SHIV感染系に9F11が反応する事が確認されたので、抗体投与の安全性や効果の検討を進める。

B. 研究方法

9F11が反応する抗原分子を特定するために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して、p70分子を同定した。P70遺伝子を用いてリコンビナントp70蛋白を作成精製した。更にウサギポリクローナル抗体を作成する。また、感染細胞をCHAPSにて可溶化し、9F11カラムによるアフィニティー精製などを行った後、抗原のN-末端アミノ酸の解析を行い、30kD蛋白のアミノ酸部分情報を得た。その情報に基づいてmixed primerを作成して対応遺伝子の同定を進める。

患者末梢血からHIV感染細胞をIgM抗体と補体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名古屋医療センターと協力して行った。

同センターの倫理委員会の承認および患者のインフォームドコンセントを得た上で、感染者からのヘパリ

ン末梢血5mlの供与を受けた。感染末梢血CD4陽性リンパ球分画をstem sepにより作成し、その初代培養を行った。患者CD4細胞に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一晚反応させた後、細胞を洗浄して抗体を除去する。抗体除去後、抗CD3抗体およびIL2添加刺激培養を行い培養上清中に放出されるp24量をELISAにて測定した。また、HIVプロウイルスの測定系を用いて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法等を活用した。

Nefに対するヒトIgMモノクローナル抗体CF8を作成した。しかし、CF8細胞株の抗体産生効率が充分でないので、リクローニングおよびハイブリドーマ培養法を検討した。さらにペプチドアレイ法を用いて感染細胞反応性の抗Nef抗体の反応エピトープ解析を行った。

IgM抗体の産生効率の増大を目的とした培養法の検討を行った。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。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ので、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、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 p70 (仮称) を同定した。70 kDa 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り、細胞膜表面上に現れ抗体の認識できる標的になることが確かめられた。リコンビナント p70 およびそのウサギポリクローナル抗体を用いて感染細胞での反応性を検討した結果、HIV 感染細胞に特異的に反応する事が確かめられた。潜伏感染細胞 OM10.1 においても反応性が確認された。さらに Northern blot 解析においても、mRNA 発現が感染細胞において有意に上昇する事が確認された。また、感染細胞抽出タンパク質の Western blot では 70 kD のほかに 30 kD に強いバンドが認められた。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。そこで、30 kD 分子を同定するために、HIV-III B 感染細胞および HTLV-1 感染細胞株 MT-4 を 5% CHAPS にて可溶化した。可溶

化膜分画を 9F11 カラムを用いて affinity 精製を行った。精製抗原分画を用いて N 末端アミノ酸解析を行った。得られた N 末端アミノ酸情報をもとにデータベースサーチを行ったが、相当する配列蛋白を検出することは出来なかった。

HIV 感染患者末梢血検体 38 例中リンパ球培養できたのが 23 例であり、このうちの 6 検体で p24 量が検出された。9F11 添加により、これらのすべての検体で 98% 以上の p24 産生の抑制が検出された。そのうちの 4 例は完全抑制を示した。

細胞膜 Nef に反応するヒト抗 Nef-IgM モノクローナル抗体 CF8 を産生する細胞株のリクローニングおよび培養条件などの検討に成功した。培養上清より抗体を回収精製した。III B 株 Nef 配列を用いて、10 残基の 2 残基シフトにてペプチドアレイを膜状で合成作製して、抗体反応エピトープを解析した。感染細胞上で反応するマウス抗 Nef-IgM 抗体 9F、ヒトマウスキメラ抗 Nef-IgM 抗体 3B4B、および CF8 を用いて反応エピトープを比較検討した。

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 Pep-A を創生し、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。9F11 はサル SIV/SHIV 感染末梢血に反応性および補体依存性細胞傷害を誘導出来る事が確認された。この SIV/SHIV 感染サ

ルモデルにおける *ex vivo* および *in vivo* の予備実験を行った。

D. 考察

9F11 抗原は HIV 感染により発現誘導され、細胞膜上に現れる分子である。これは HTLV-I でも同様な現象が起こるので、ウイルス感染に共通する現象である可能性もある。9F11 と反応する抗原分子 p70 は 70 kD 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 kD の抗原分子が検出されている。その部分アミノ酸配列より p70 とは異なる分子である可能性が高まっており、その異同に関する解析を完結することが重要であると考えている。

HIV 感染患者末梢血リンパ球に対する解析より、9F11 は高い抗 HIV 活性を発揮できることが確認された。従って、来年度は、さらに患者の感染状態および HAART 治療の効果などの状況において、効果の違いを臨床経過にあわせて解析を拡大していく予定を継続課題とする。また、9F11 は HTLV-I 感染細胞に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視野に置いて検討する。

Nef に対するヒト IgM モノクローナル抗体 CF8 については、ペプチドアレイ法による反応エピトープの解析により、細胞膜上 Nef に対する CF8 反応部位が同定された。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 を得た。SIV/SHIV 感染サルを用いての 9F11 投与実験における安全性や有効性の解析をあわせて検討する準備が整ったので、次年度には *in vivo* 解析を開始したい。さらに、9F11 などのヒト IgM 抗体を大量に安定的に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え、検討を開始している。

E. 結論

感染患者の末梢血リンパ球初代培養に対するヒト IgM モノクローナル抗体 9F11 の有効性が確認された。

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

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

HIV感染細胞を補体依存性に排除する ヒトモノクローナル抗体の研究

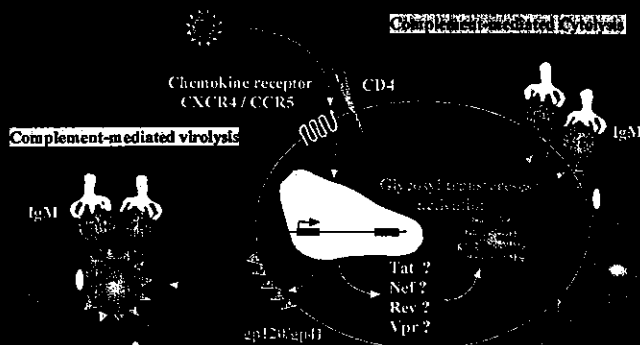
岡田則子、金原紀章、飛沢笑山¹、三浦智行²、石田高司³、
Yin Shuping、土肥名月、岡田秀親

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学、分子内科学³、
神戸環境保健研究所寄生体部¹、
京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設²

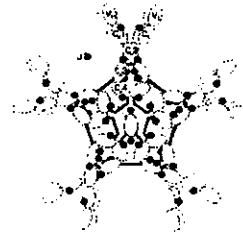
研究背景

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



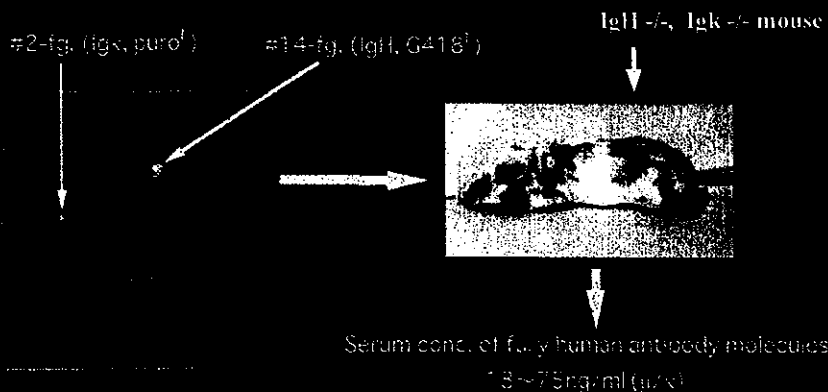
研究目的



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感染症に対する新しい抗体治療法を開発する。

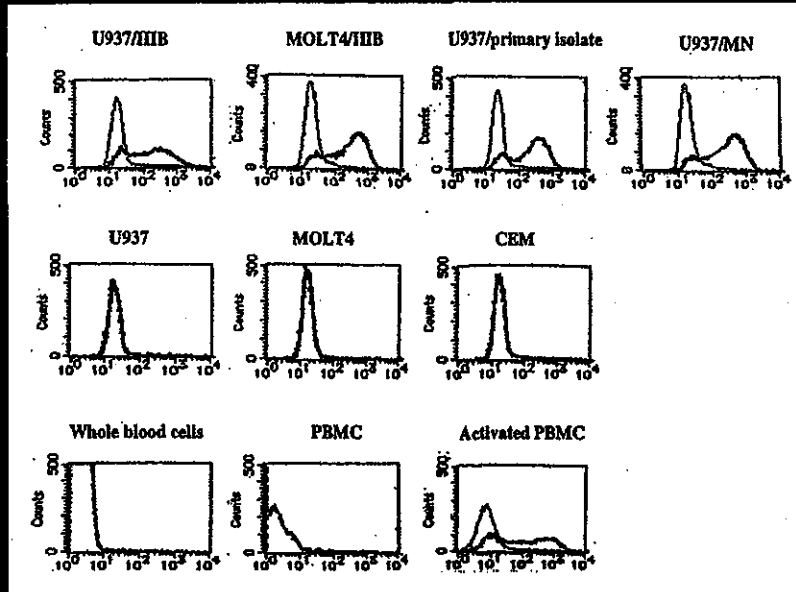
Production of human antibodies in Trans-Chromosome mouse (TC Mouse™) by Kirin Brewery Co.



TC-mouse contains all human Ig genes with Human Vh(81), Human Vk (38 X 2)

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

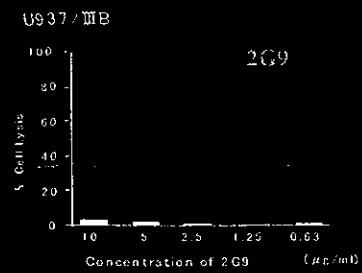
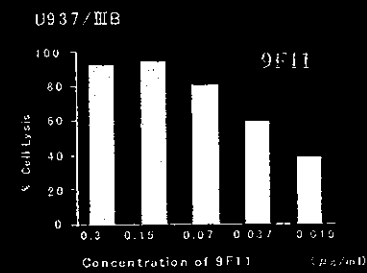
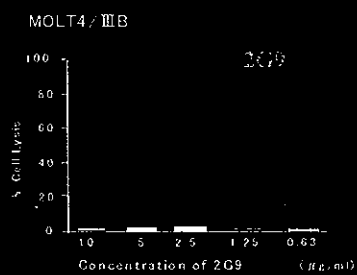
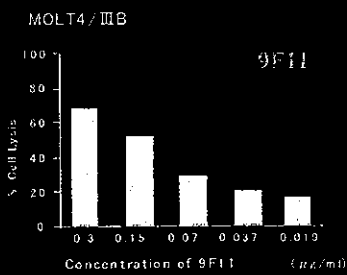
9F11-Reactivity



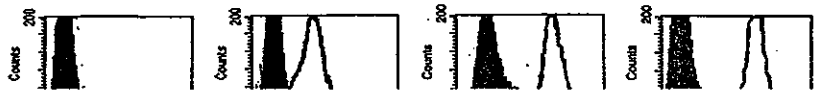
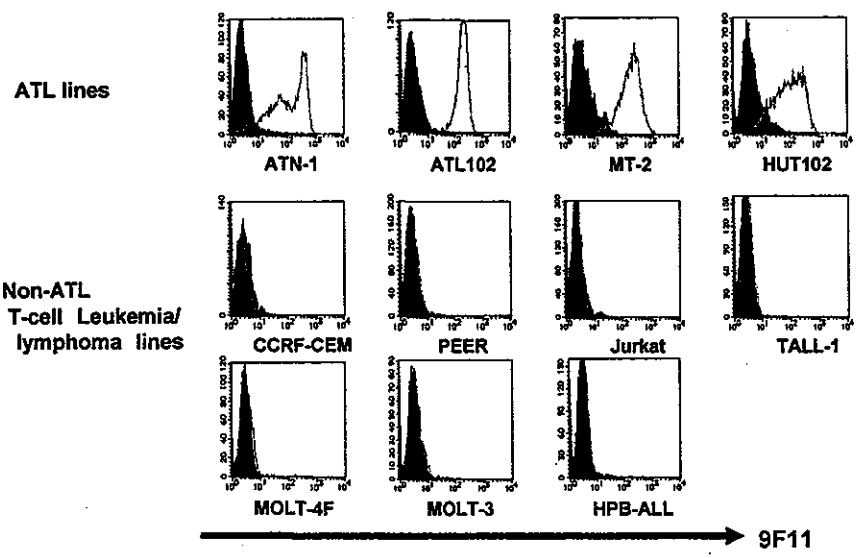
9F11-1

Complement-mediated Cytolysis

9F11

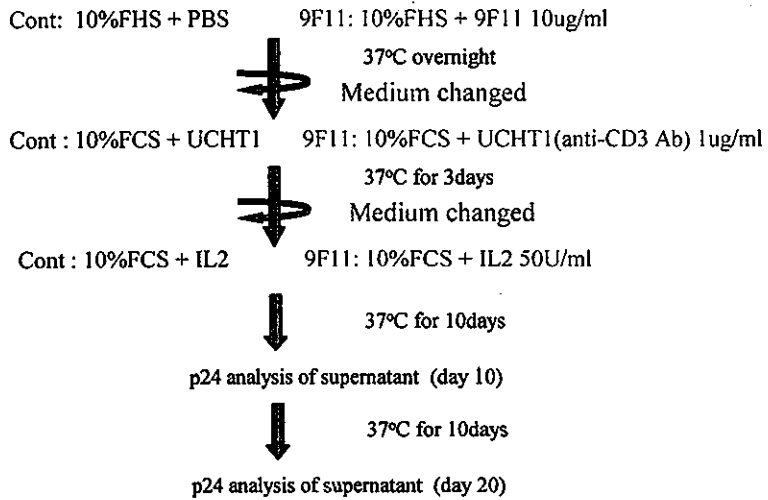


9F11 Antibody Specifically Reacted with ATL Cell Lines

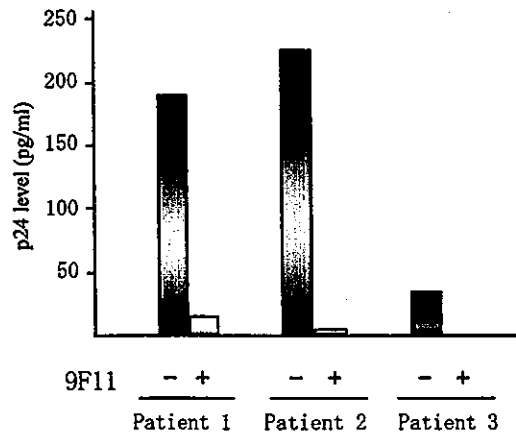


Experimental Protocol for detection of anti-HIV effect of 9F11 ex vivo

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



9F11 suppresses 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

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

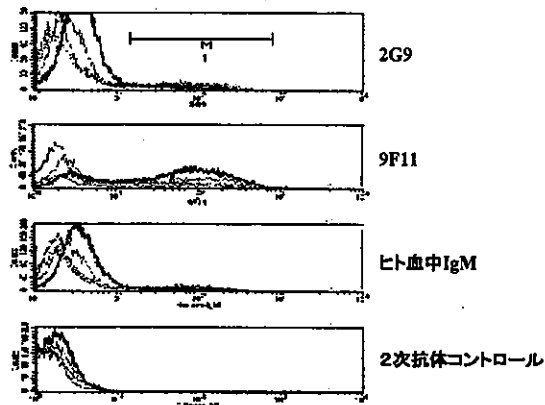
9F11(10 ug/ml)を補体存在下にリンパ球と一晩反応後、メディウム交換にて抗体を除去し、抗CD3抗体添加刺激によるHIVウィルスの叩き出し培養を行った。
末梢血検体38例中リンパ球培養できた23例のうち、ウィルス検出可が6例であった。

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 \sim 5 pg/mlである。

9F11抗体のSIV感染サルリンパ球細胞に対する反応性

SIV(Mac 239株)を感染させて、10週間後に生存感染サルの末梢血よりリンパ球を分離し抗体の反応性を検討した。



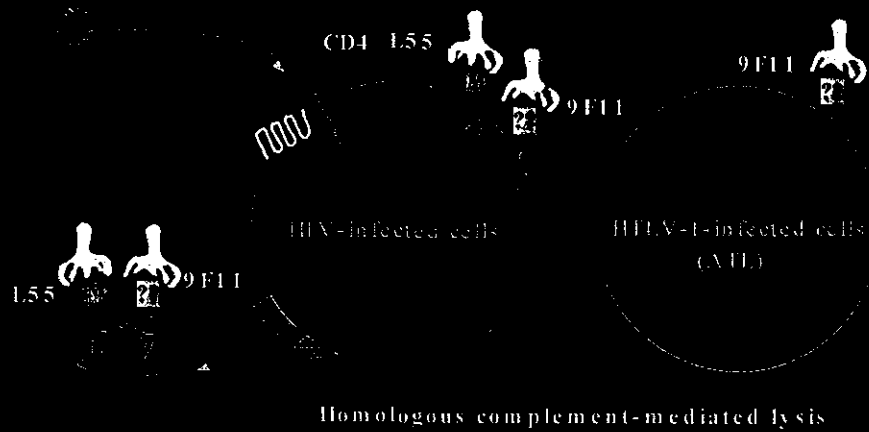
図：SIV感染サル末梢血白血球のIgM抗体反応性

結語

- 9F11はHIV感染細胞に反応して1 μ g/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30kDの糖蛋白である。
- 9F11抗原は、HTLV-I感染細胞であるATL細胞にも発現しているため、レトロウイルス感染により発現誘導される抗原の可能性が高い。
- 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。
- 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、ウイルス検出が可能であった6例全てで、抑制率97%以上の高い抗ウイ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。
今後、抗原解析を行うと共に、臨床応用へ向けた解析を進める。

Human IgM monoclonal antibodies effective to HIV-1 infected cells and HTLV-I-infected cells



HIV-1 感染患者 CD4 陽性 T リンパ球における 9F11 抗原の分布 と陽性細胞率の検討

分担研究者 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 萩原智子 (国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター)
土肥名月 (名古屋市立大学大学院分子医学研究所)
岡田則子 (名古屋市立大学大学院分子医学研究所)

研究概要

HIV-1 感染患者 22 例の CD4 陽性 T リンパ球における 9F11 抗原の分布と陽性細胞率の検討を行った。陽性細胞率は 4~29% (平均 12%) と広い分布を示した。陽性細胞における 9F11 抗原は細胞膜上にスペckル状に分布していた。9F11 陽性細胞率は CD4 陽性 T リンパ球数の多い症例ほど低い傾向にあったが、血中ウィルス量の間には特別な相関は観察されなかった。

A. 研究目的

9F11 抗体は MOLT4-III B を免疫して得られた抗体であり、フローサイトメトリーにより HIV-1 感染 MOLT4 細胞上にその抗原の存在が証明され、一方、非感染 MOLT4 細胞にはその抗原が発現していないことが確かめられている。これに加え、HIV-1 感染患者 CD4 陽性 T リンパ球における 9F11 抗原の分布、陽性率等に関するフローサイトメトリー及び免疫染色化学的研究の推進が求められている。一方、本年度の岡田則子らとの共同研究の結果から、初代培養した HIV-1 感染 CD4 陽性細胞が 9F11 抗体添加により排除されるケースがあることが明確に示されたことから、患者 CD4 陽性 T リンパ球を対象に、9F11 抗原に関する免疫化学的研究を実施し、抗原分布と陽性細胞率の検討を行った。

B. 研究方法

患者末梢血からの CD4 陽性 T リンパ球の精製:

StemSep STS-14052 (Stem Cell Technologies Ins.)を用いてネガティブセレクションにより精製し、遠心後のペレットをサンプルとした。

ブロッキング:

10mg/ml normal goat IgG (CHEMICON INC.PP40) 10 μ l を添加して室温で 10 分間放置した。

9F11 IgM 抗体の反応:

2 μ g/ml の 9F11 抗体を 50 μ l 添加し、氷中で 30 分間反応させた。

二次抗体の反応:

PBS(-)+2%FCS で 2 回洗浄後、2.5 μ g/ml の Alexa Fluor 488 labeled goat anti-human IgM (μ chain) (Molecular Probes A-21215) 50 μ l を添加し、遮光した氷中にて 30 分間反応させた。

固定スミア標本の作製:

PBS(-)+2%FCS で 2 回洗浄後、スミア

標本を作製し、4°Cの4%PFAにて10分間固定した。PBSで3回洗浄後、DAPI II (Vysis Inc. 32-804831)で後染色及び封入した。

鏡検：

蛍光顕微鏡にてCD4陽性Tリンパ球約600個中の9F11陽性細胞を数え、陽性率を算出した。

C. 研究結果

9F11陽性細胞：

陽性コントロールとしてMOLT4-III Bを染色したところ、全ての細胞の細胞膜上に9F11抗原が検出された(緑色蛍光)。陰性コントロールとしたMOLT4は全く染まらなかった(Fig. 1)。次いで22検体の患者CD4陽性Tリンパ球について染色した。その結果、9F11抗原は細胞膜上に検出された(Fig. 2)。MOLT4-III B細胞に比べ9F11抗原はよりスペckル状に検出されたのが特徴であった。その陽性率は4~29(平均12)%であった(Table 1)。染色時に各検体について9F11抗体を添加しない陰性コントロールを立てたがその陽性率は0~4(平均1)%であった。このことから実験結果は9F11抗原の特異的シグナルを検出したと判定した。2検体の健常人CD4陽性Tリンパ球についても同様に染色した結果、5%の細胞が陽性に染まった(Table 2)。染色パターンは患者検体で得られたパターンと大きな違いはなかった(Fig. 2)。

9F11陽性率とCD4陽性Tリンパ球数及び血中ウィルス量との相関性について：

①CD4陽性Tリンパ球数の多い症例ほど9F11抗原陽性細胞率が低い傾向にあっ

た(Fig. 3)。

②血中ウィルス量と9F11陽性細胞率には相関はみられなかった(Fig. 4)。

D. 考察

22症例のHIV-1感染患者由来のCD4陽性Tリンパ球を対象にした今回の研究で、HIV-1感染により9F11抗原の発現は誘導・増幅されることが明らかになった。しかし、4症例の9F11抗原陽性細胞率は健常人レベル(5%)であり、その陽性率も4~22(平均12)%と広い分布を示すことから、発現の増幅度も症例ごとに異なることも明らかになった。

今回の研究は免疫化学的手法を用いた研究であるので、健常人CD4陽性Tリンパ球中の9F11抗原の発現レベルと感染患者CD4陽性Tリンパ球での発現レベルを比較することは困難である。この問題を解決するために、フローサイトメトリーにて、より定量性をもった検討を行いたいと考えている。次に、HIV-1感染細胞のすべてに9F11抗原が誘導されているかの疑問点についてであるが、残念ながら今回の研究結果からはその回答は得られない。HIV-1と9F11抗原の二重染色を施行することが重要と思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wada, K., Nagai, H., Hagiwara, T., Ibe, S., Utsumi M. and Kaneda T. Delayed HIV-1 Infection of CD4⁺ T Lymphocytes from Therapy-naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy

Numbers. Microbiology & Immunology 48, 767-772 (2004)

- 2) Nagai, H., Wada, K., Morishita, T., Utsumi, M., Nishiyama Y. and Kaneda T. New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. J. Virol. Methods, in press

2. 学会発表

- 1) HIV 感染症治療のモニタリング — HIV-1 DNA の定量測定—
永井裕美、和田かおる、西山幸広、金田次弘
第 14 回抗ウイルス化学療法研究会 (平成 16 年 5 月)。
- 2) HIV-1 mRNA levels in peripheral CD4+T lymphocytes from patients responding well to HAART.
(HAART 著効患者の末梢血 CD4 陽性 T リンパ球中の HIV-1 mRNA レベル) 金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会シンポジウム (平成 16 年 12 月)。
- 3) 種々の感染病態における末梢 CD4 陽性 T リンパ球内の HIV-1 DNA レベル 永井裕美、和田かおる、照沼 裕、水野善文、多和田行男、間宮均人、内海 眞、濱口元洋、とう学文、伊藤正彦、西山幸広、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会 (平成 16 年 12 月)。

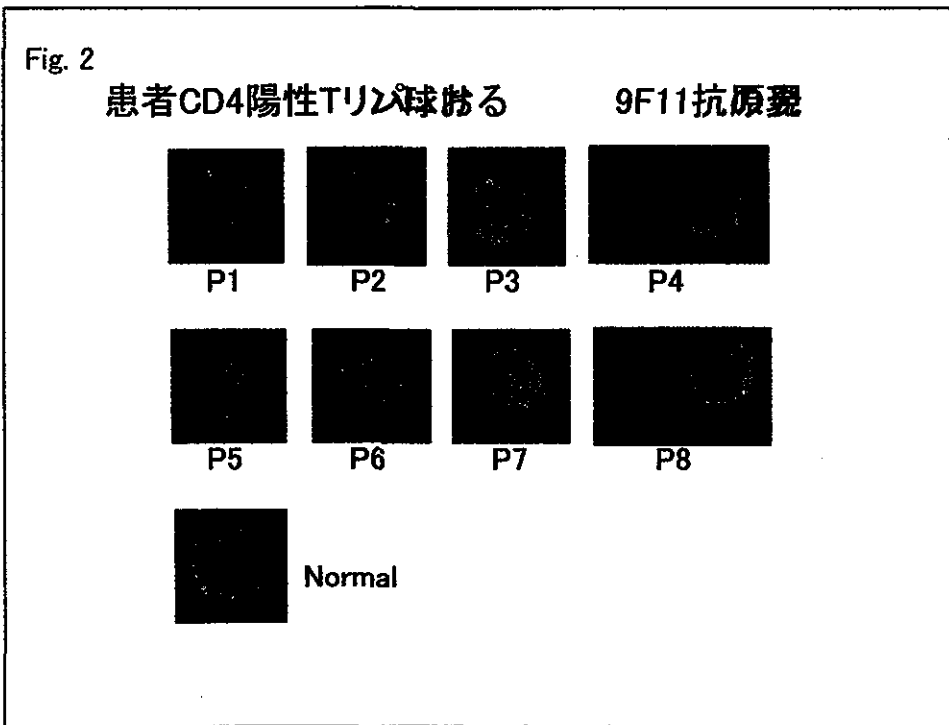
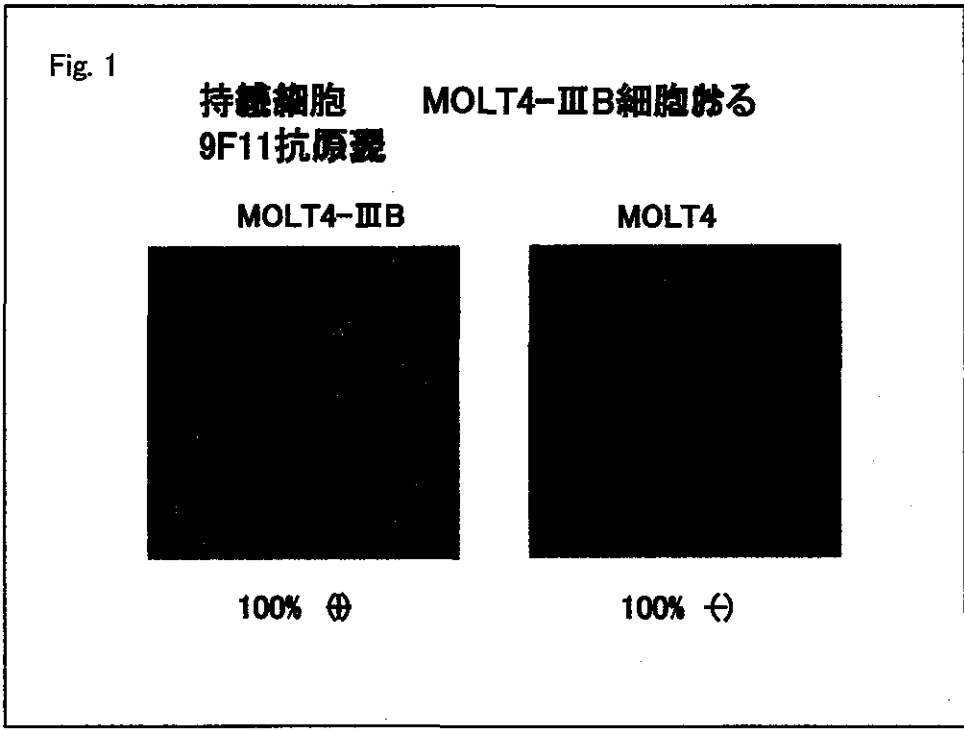


Fig. 3

9F11抗腫瘍細胞と CD4陽性Tリンパ球

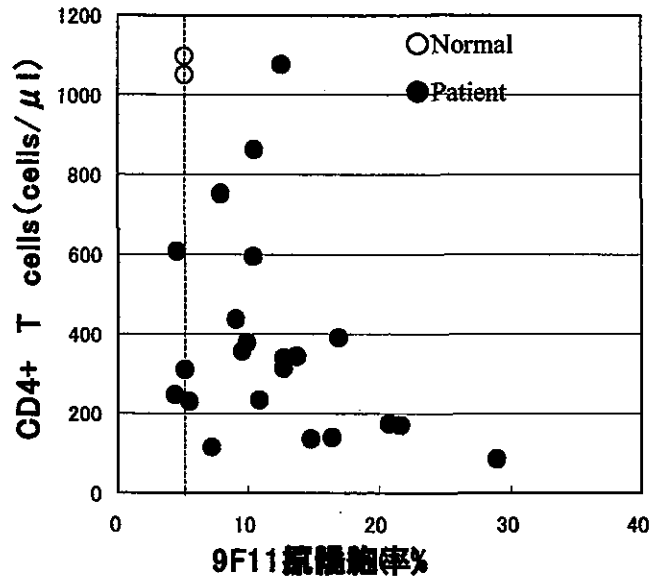


Fig. 4

9F11抗腫瘍細胞血中濃度

