

200500689A

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17年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 岡田則子

平成18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17年度 HIV 研究発表会	
II. 分担研究報告	
1. HIV 感染細胞に反応するヒト IgM モノクローナル抗体の研究	19
岡田則子	
(資料)HIV 感染症におけるヒト IgM 抗体に関する研究発表	
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)フローサイトメリーによる HIV-1 感染患者の末梢血 Tリンパ球における 9F11 抗原発現の解析	
3. IgM 抗体依存性の炎症反応の制御	33
岡田秀親	
(資料)過剰補体反応により誘導される炎症制御の研究発表	
4. 患者リンパ球初代培養に対する IgM 抗体と補体作用の解析	73
飛沢笑山	
(資料)ヒト IgM モノクローナル抗体 9F11 の抗 HIV 効果	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83
IV. 研究成果の刊行物 別刷	85

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、HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体は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、SWAP-70 を新たに同定した。さらに、9F11 抗体は HIV 感染細胞では 30kD とも反応するのでその異同を確認すべく細胞分画の affinity 精製を行い、N-末端アミノ酸解析を継続的に行ったが、データベース登録の範囲では決定されなかった。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、mRNA および細胞中 DNA を定量する解析を検体数を増やして検討した。その結果、9F11 抗体は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た。抗 Nef 抗体 CF8 においても、抗 HIV 活性が検出され、これらのヒトモノクローナル IgM 抗体の有用性が高く評価された。

分担研究者:金田 次弘((独)国立病院機構名古屋医療センター血液免疫研究部 部長)、岡田 秀親(福祉村病院長寿医学研究所 顧問研究員)、飛沢笑山(神戸市環境保健研究所 研究職員)

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 に対するヒト IgM 抗体(CF8 など)を作用させたときの効果も検討する。患者末梢血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炎症副作用の制御も想定し炎症抑制ペプチド剤の併用による効果を検討する。

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(9F11 抗体など)を作成することができた。これらのヒト IgM 抗体は HIV 感染細胞に補体と共に働いて細胞障害を起こす。これらのヒト抗体が HIV

B. 研究方法

ヒトIgM抗体である9F11抗体の抗原を同定するために抗体スクリーニングでcDNAクローニングを行う。そのcDNAで作成したリコンビナント蛋白質をウサギに免疫して作成した抗体でも、HIV感染細胞などでの発現状況を解析する。一方、9F11抗体アフィニティーカラムなどを用いて9F11抗原の精製も行い、抗原分子の同定を試みる。精製分離した抗原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感染患者末梢血細胞での9F11抗原の分布を蛍光抗体染色法で解析する。更に、全身での抗原発現状況を把握するためにビオチンダイレクトラベル化IgM抗体の作成を行い、安定的な9F11抗原などの検出を試みる。HIV感染患者の末梢血リンパ球の初代培養に9F11抗体等のヒトIgM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の排除を試みる。感染細胞の抑制はP24のELISA、HIV遺伝子のPCRで解析する。

Nefに対するヒトIgMモノクローナル抗体CF8の無血清培養による安定的生産および抗体精製を試みる。HIV持続感染株や臨床材料による抗HIV効果も検討する。さらに抗HIV効果のメカニズム解析を検討する。

9F11抗体のSIV感染細胞などへの反応性も解析する。また、サル組織や血液細胞での9F11抗原発現動態を検討し、ヒトにおける発現様態を比較検討し、サルSIVを用いた検討を評価する。9F11抗体を効率よく大量に作製するた

めに、抗体遺伝子をCHO細胞に導入しリコンビナント抗体の作製も試みる。また、過剰な補体反応による副作用に対処するために開発したC5a阻害ペプチドの活用法についての検討も行う。

(倫理面への配慮)

HIV感染患者の末梢血の解析は、(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。個人情報 は適切に管理する。

C. 研究結果

9F11抗体でSWAP70のcDNAがクローニングされた。リコンビナントSWAP70で作成した抗SWAP70抗体は、HIV感染細胞膜にSWAP70が発現していることを示した。しかし9F11抗原は30kDであるので、9F11抗原を精製しアミノ酸配列の解析を試みた。解析されたアミノ酸配列にはSWAP70との相同性が検出されなかった。HIV感染患者末梢血リンパ球に9F11抗体を新鮮ヒト血清補体と共に反応させた後IL2存在下で増殖培養の検討を200症例以上について行った。HARRT治療の影響によりウイルス産生を検出できた症例は全体の5%であった。ウイルス産生が検討できた症例の内、40%の症例で上清中P24が完全に抑えられた。それらの症例においてプロウイルスDNA量が激減する症例も確認された。Nefに対するIgM抗体であるCF8抗体及び3B4B抗体においても感染拡大実験において上清中P24の抑制効果が認められた。SHIVやSIVを感染させた

サル末梢血にも 9F11 抗原陽性細胞の出現が認められた。しかし、NK 細胞の一部などに 9F11 抗原陽性細胞が確認された。SIV 感染で AIDS 病態を呈する 3頭のサルに 5mg/kg の 9F11 抗体を 1週間に 3回のスケジュールで静脈内投与を試みた。最初のサルでは、異常症状は認められなかったが、2頭目では 2回目の投与で免疫複合体形成によると考えられるショック症状を呈して死亡した。3頭目でも軽度のショック症状が認められた。ショック死したサルの組織や血漿を用いてその原因を追究中である。9F11 抗体を HIV 感染 MOLT4細胞に作用させると TNF α を産生させる作用が認められたので、この現象もショック症状の発現に関与している可能性もある。過剰補体活性化反応に伴うショック症状を制御するために C5a 阻害ペプチド (AcPepA) の効果を検討した。C5a は強力な起炎因子であり HIV 産生増強作用がある。そこで C5a 阻害ペプチドが抗 HIV 効果を示すことを検証した。

D. 考察

9F11 抗体の抗原遺伝子として SWAP70cDNA がクローニングされ、SWAP70に対する抗体での解析でも HIV 感染細胞膜上で SWAP70 の発現が認められた。しかし 9F11 抗原は 30kD を示し、SWAP70 との異同の解析を進めている。精製した 9F11 抗原の N 末 10個のアミノ酸配列に一致するものはデータベースには見つからず、SWAP70 と 9F11 抗原との関連性を解析中である。患者末梢血リンパ球を 9F11 と補体血清で処理す

ると 40%の患者において p24 の産生を完全に抑えることが出来た。プロウイルス陽性細胞が激減する症例も確認されているがプロウイルス陽性細胞は完全には消失しない症例も存在するので、LAK-T 細胞、抗 Nef 抗体、化学療法剤などの併用で、プロウイルス陽性細胞を完全に排除する方法を開発したい。補体活性化による過剰炎症反応の制御には C5a 阻害ペプチドの活用が可能であり、副反応の制御によりヒト IgM 抗体 9F11 やヒト抗 NefIgM 抗体 CF8 の AIDS 治療における有用性が期待できる。

E. 結論

感染患者の末梢血リンパ球初代培養 *ex vivo* 実験において広範囲の有効性が高く得られた事は重要である。ヒト IgM 抗体治療の有用性が高まり、社会的意義も大きい成果と考えている。

複数の IgM 抗体や化学療法剤を組み合わせ、プロウイルス陽性細胞を完全に排除する条件を究明したい。

IgM 抗体が有用であり実用化の可能性が高まった。

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 論文発表

岡田則子(主任研究者)

- 1) Kimbara, N., Dohi, N., Miyamoto, M., Asai, S., Okada, H. and Okada, N. Diagnostic surface expression of SWAP-70 on HIV-1 infected cells. *Microbiol. Immunol.* 2006, in press
- 2) 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. Gastroenterol Hepatol* 2005, 20, 1344-1351
- 3) He, L., Asai, S., Kawamura, T., Kimbara, N., Tada, T., Okada, H. and Okada, N. Hepatitis induced by an IgM monoclonal antibody against procarboxypeptidase R. *Microbiol. Immunol.* 2005, 49(4) 373-380
- 4) Abe, M., Hama, H., Shirakusa, T., Iwasaki, A., Ono, N., Kimura, N., Hugli, T.E., Okada, N., Katsuragi, T. & Okada, H. Contribution of anaphylatoxins to allergic inflammation in human lungs. *Microbiol. Immunol.* 49: 981-986. 2005.
- 5) 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. *Microbiol. Immunol.* 49: 447-459. 2005.
- 6) Joh, T., Sasaki, M., Kataoka, H., Tanida, S., Itoh, K., Kondo, Y., Ogasawara, N., Oshima, T., Okada, N., Ohara, H., Nomura, T & Itoh, M. Helicobacter pylori eradication decreases the expression of GPI-anchored complement regulators, DAF and HRF20 in human gastric epithelium. *J. Gastroenterol Hepatol.* 20: 1344-1351, 2005.
- 7) 岡田則子 HIV 感染症におけるヒト IgM 抗体療法の可能性-抗体医療の最前線- 第257回 CBI 学会研究講演要旨集 257:2 (2005)
- 8) 岡田則子 HIV 感染症におけるヒト IgM 抗体の研究 第16回日本生体防御学会抄録集 16:47 (2005)
- 9) Noriko Okada Human IgM monoclonal antibodies which recognize and eliminate HIV-1 infected cells. In: Elimination of HIV-1 latently infected cells. 日本エイズ学会学術抄録集 18:324 (2004)
- 10) 岡田則子 ヒト IgM 抗体を活用した免疫治療法 バイオ治療法研究会講演集 8:8 (2004)
- 11) 岡田則子 ヒト IgM モノクローナル抗体 9F11: HIV 感染のみならず ATL 治療にも応用可能 Medical Tribune 37:9, 2004
- 12) He, L., Asai, S., Kawamura, T., Kimbara, N., Tada, T., Okada, H. & Okada, N. Hepatitis induced by an IgM monoclonal antibody against procarboxypeptidase R. *Microbiol. Immunol.* 49: 373-380, 2005.
- 13) Hosokawa, M., Imai, M., Okada, H. & Okada, N. Inhibition of HIV-1 infection in cells expressing an artificial complementary peptide. *BBRC* 324: 236-240, 2004.
- 14) Fujii, Y., Murase, Y., Otake, K., Yokota, Y., Omoto, S., Uayashi, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Okuyama, H., & 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
- 15) Imai, M., Ohta, R., Okada, N. & Tomlinson, S. Therapeutic inhibition of a complement regulator enhances antibody therapy in a model of mammary adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 110: 875-881, 2004
- 16) Fujita, E., Farcus, I., Campbell, W., Baranyi, L., Okada, H & Okada, N. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide which is complementary to a region of C5a. *J. Immunol*, 172: 6382-6387, 2004.
- 17) Otake, K., Omoto, S., Yamamoto, T., Okuyama, H., Okada, H., Okada, N., Kawai, M., Saksena, N. K., & 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.

分担研究者
金田 次弘

- 1) Nagai, H., Wada, K., Morishita, T., Utsumi, M., Nishiyama, Y. & Kaneda, T. New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *Virology Methods* 124, 157-165 (2005).
- 2) Takahashi, M., Yoshida, M., Oki, T., Okumura, N., Suzuki, T. & Kaneda, T. Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1286-1290 (2005).
- 3) Hagiwara, T., Hattori, J. & Kaneda, T. In situ hybridization method for detection of HIV-1 DNA in virus-infected cells and subsequent detection of cellular and viral proteins. In *In Situ Hybridization Protocols 3rd edition* (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149 (2005).
- 4) Wada, K., Nagai, H., Hagiwara, T., Ibe, S., Utsumi, M. & Kaneda, T. Delayed HIV-1 Infection of CD4⁺ T Lymphocytes from Therapy-naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers. *Microbiol. Immunol.* 48: 767-772, 2004.

岡田 秀親

- 1) Abe, M., Hama, H., Shirakusa, T., Iwasaki, A., Ono, N., Kimura, N., Hugli, T.E., Okada, N., Katsuragi, T. & Okada, H. Contribution of anaphylatoxins to allergic inflammation in human lungs. *Microbiol. Immunol.* 49: 981-986, 2005.
- 2) Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kimbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X., & Okada, H. Human IgM monoclonal antibodies reactive with HIV-1 infected cells generated using a

trans-chromosome mouse. *Microbiol. Immunol.* 49: 447-459, 2005.

- 3) Fujita, E., Farcus, I., Campbell, W., Baranyi, L., Okada, H. & 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., & 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., & 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, V.M., Okada, H., and Okada, N. Mouse Crry/65 neutralized tumor vaccine induces antitumor activity in vivo. *J. Immunol.* 173: 205-13, 2004.
- 8) Asai, S., Sato, T., Tada, T., Miyamoto, T., Kimbara, N., Motoyama, N., Okada, H. & Okada, N. Absence of ProCarboxypeptidase R induces Complement-mediated lethal inflammation in LPS-primed mice. *J. Immunol.* 173:4669-74, 2004.

飛沢(呉)笑山

- 18) 1) Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kimbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X., & Okada, H. Human IgM monoclonal antibodies reactive with HIV-1 infected cells generated using a trans-chromosome mouse. *Microbiol. Immunol.* 49: 447-459, 2005.

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

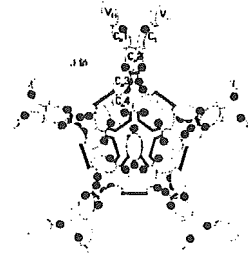
- 人:岡田秀親、岡田則子;発明者:岡田秀親、岡田則子
- ・国際出願番号 PCT/JP03/08305(2003年6月30日)
 - ・特願 2003-74312(平成15年3月25日提出)「活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト IgM 抗体」出願人:岡田秀親、岡田則子;発明者:岡田秀親、岡田則子
 - ・国際出願番号 PCT/JP03/08306(2003年6月30日)



**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
国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター 金田次弘
福祉村病院長寿医学研究所 岡田秀親
神戸環境保健研究所 飛沢笑山

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感染症に対する新しい治療法を開発する。

研究実施課題

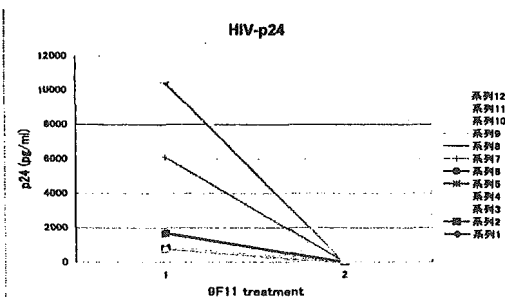


- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、TCマウスおよびKMマウス(キリンビール社)を用いて樹立した。
- 9F11抗体はHIV感染細胞に反応して補体依存性の細胞死およびHIVウイルス溶解を引き起こす。
- 2G9抗体はHIV感染細胞および潜伏感染細胞にも反応してアポトーシス誘導による細胞死を引き起こす。
- CF8、3B4B抗体はNefに対するIgM抗体であり、HIV感染細胞に特異的に反応する。
- 9F11および2G9の反応する抗原分子を同定し、HIV感染症におけるこれらの抗原発現の意義を明確にする。
- Nefの細胞膜上での免疫標的としての意義を解明し、抗Nef-IgM抗体の有効性を検討する。
- * これらのヒトIgM抗体がHIV感染患者の血液中の感染細胞や、HAART治療後に残存する潜伏感染細胞などを排除できることを立証し、HIV感染症の治療に有用であることを検証する。

9F11患者抗HIV効果まとめ

HIV-1感染者末梢血CD4リンパ球ex vivo解析: 9F11抗体の抗HIV効果

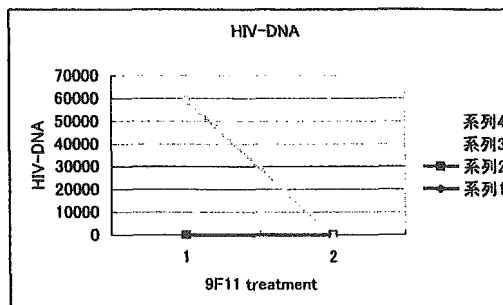
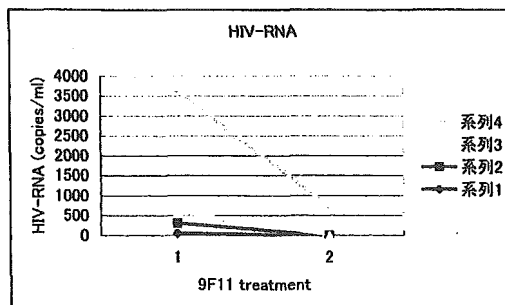
CD4陽性細胞に10ug/ml 9F11を10%FHS存在下に1晩反応後、wash outしてから、抗CD3抗体及びIL2存在下に培養し、10日後のp24およびHIV-RNA, 20日後のHIV-DNA数を解析した。



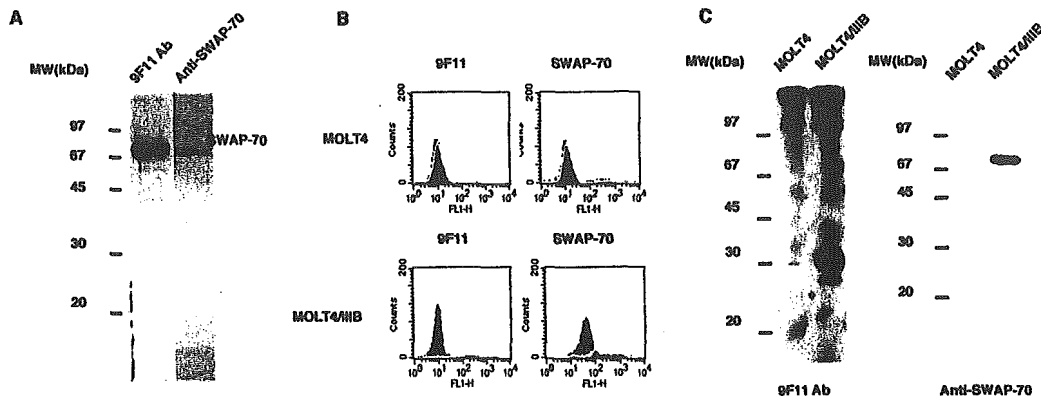
HIV-P24:
9F11処理により全例で高い抗HIV効果が認められた。p24検出可能患者12例中8例で検出限界以下になった。

HIV-RNA:
同様に、HIV-RNA検出可能患者検体において4例いずれも減少し、1例で検出限界以下となった。

HIV-DNA:
同様に、RNA解析出来た患者検体の細胞内HIV-DNAは減少した。しかし、9copies/10万個細胞以下になる例は無かった。

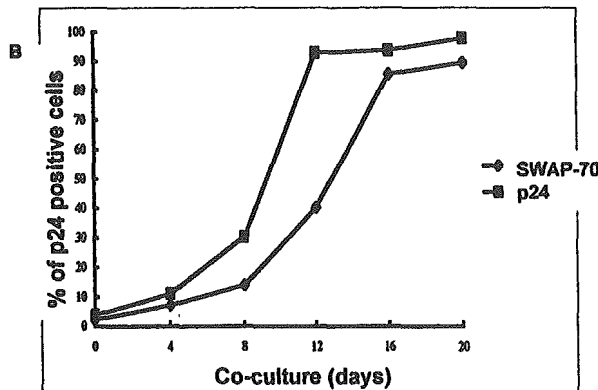
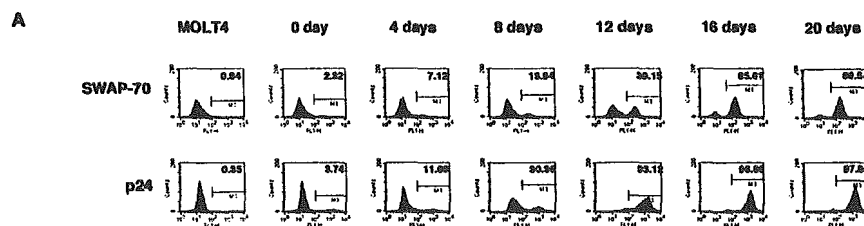


Reactivity of HIV-1 infected cells to 9F11 and anti-SWAP-70 Ab



A : Western blot analysis of rSWAP-70 with 9F11 and anti-SWAP-70 Ab
B : FACS analysis of MOLT4 and MOLT4/IIIB cells using 9F11 and anti-SWAP-70 Ab
C : Western blot analysis of cell lysate prepared from MOLT4 and MOLT4/IIIB cells

Surface Expression of SWAP-70 increased with expansion of HIV-1 infection



Naive MOLT4 : MOLT4/IIIB
 50 : 1

A : FACS analysis with anti-SWAP-70 Ab or anti-p24(KC57) Ab

B : % of Positive cells shown

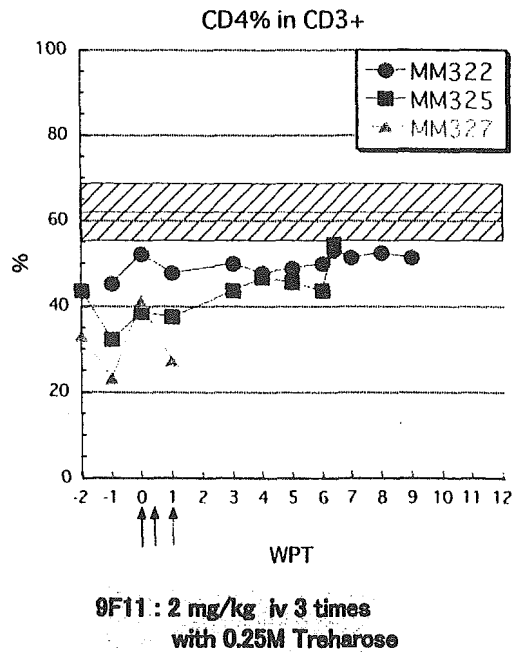
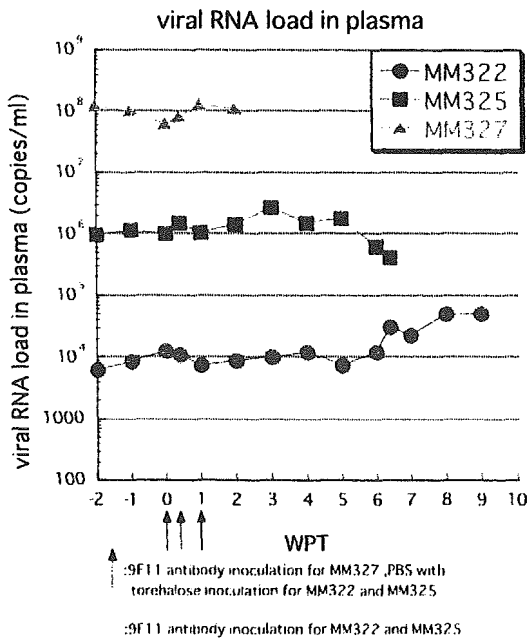
9F11抗体の解析



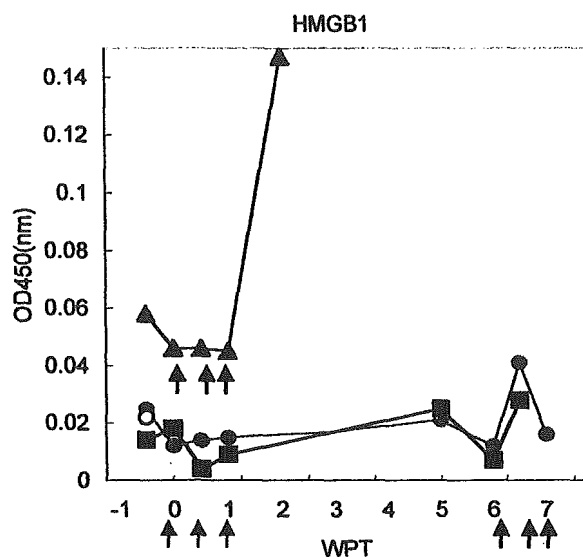
- 9F11はHIV感染細胞に反応して1ug/ml以下で補体依存性の細胞死およびウイルス溶解を誘導して、抗HIV活性を示すヒトIgMモノクローナル抗体である。
- 9F11抗原としては、HIV感染により発現誘導されて細胞膜上に現れるSWAP-70が同定された。また、さらにWestern解析で30kDの分子が認識されており、SWAP-70分子との異同を解析中である。
- 9F11はHIV感染者末梢血CD4細胞に反応する。血中のCD4細胞数の低下に伴いその反応性は上昇傾向を示し、9F11抗原発現はHIV感染病態を反映すると考えられる。
- HIV感染者末梢血CD4細胞を用いた、ex vivoでの抗HIV効果の検討を行った。その結果、ウイルス検出が可能であった12例全てでp24量の減少を認め、抑制率90%以上の高い抗ウイルス活性が検出された。また、HIV-RNAやHIV-DNA解析においても高い抑制効果が得られた。
- 9F11はHTLV-I感染細胞にも反応して細胞溶解を起こすので、HIV感染症のみならずATLIに対する治療抗体としての活用も期待できる。また、活性化CD8細胞への反応性が示され、HIV感染細胞への特異性は低いことが示唆された。
- * 9F11はサルSIV/SHIV感染細胞にも反応性を示した。そこで、臨床材料でのex vivoの結果を受けてSIV持続感染サルを用いてのin vivoトリアル実験を実施した。
- * 9F11の無血清大量培養を行い、9F11精製抗体を作成した。IgM抗体は精製保存により変性失活するので、その防止策を検討した。その結果、0.25Mトレハロースの添加が極めて有効であることが確認された。
- * そこで、3頭のSIV感染サルに、9F11有効血中濃度と考えられる 2mg/kg にトレハロース添加して、1週間に3回のスケジュールで、iv投与を行った。

9F11/SIV

Administration of 9F11 to SIV-infected Monkey

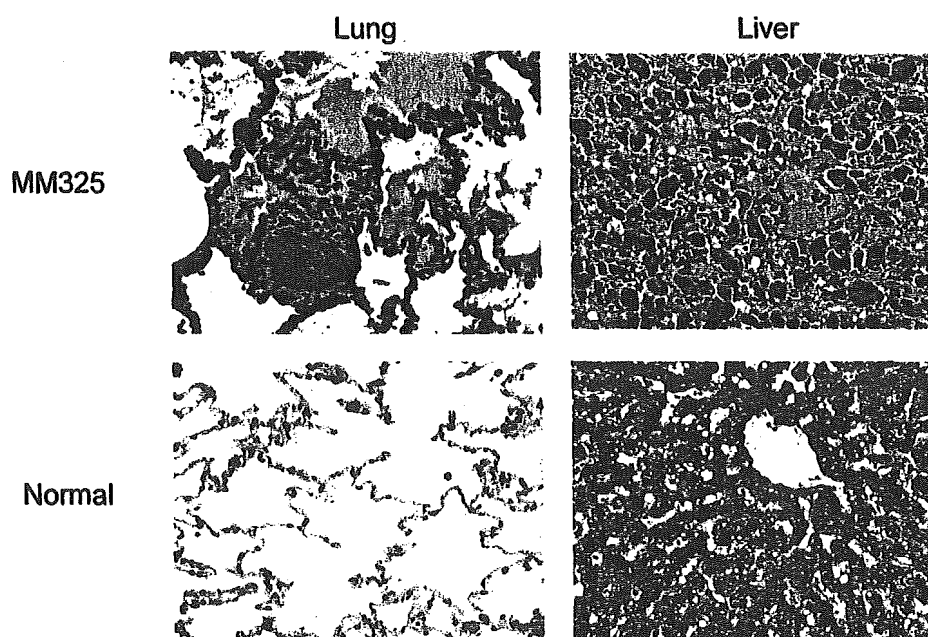


HMGB1 level in plasma during 9F11-IgM administration in SIV-infected Monkey



MM327 : AIDSにて投与
7日後に死亡
MM322 : 軽度のショック
MM325 : 投与後ショック死

9F11投与後に急死したSIV感染サル(MM325)の組織染色像(HE染色)



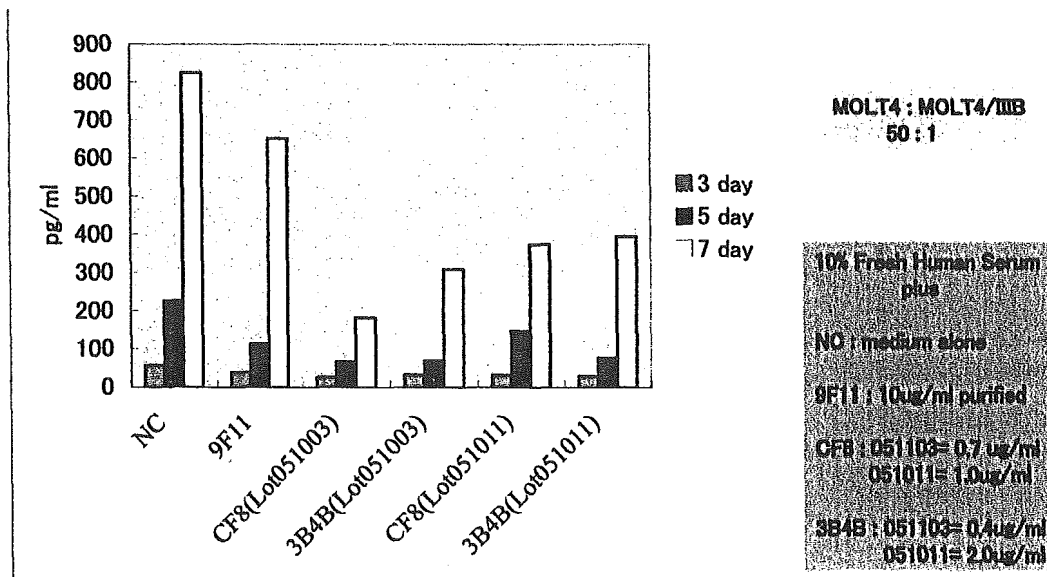
急性アナフィラキシーショック特有の強度の鬱血、浮腫が肺および肝臓で観察される。

抗Nef-IgM抗体の特HIV活性の検討

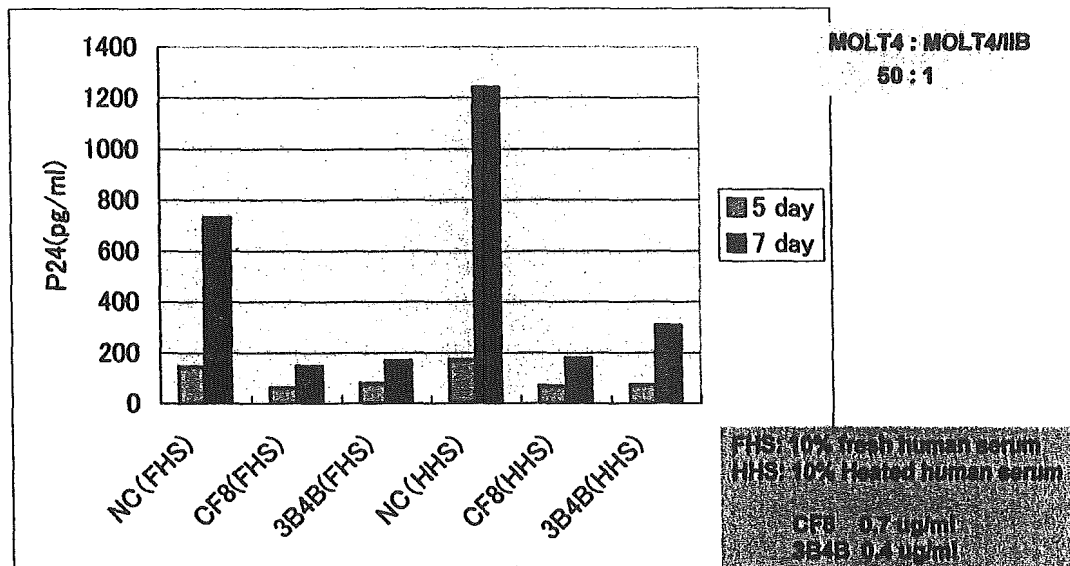


- リコンビナントNefをTCマウスおよびKMマウスに免疫した後、MOLT4/IIIIB細胞に反応するIgMクローンを選別して、3B4Bおよび2C8クローンを樹立した。
- ELISA法およびWestern Blot法にて、3B4Bおよび2C8が抗Nef抗体であることを確認した。
- これらのハイブリドーマを無血清培養に導入した。抗体産生効率を上げるために、抗体産生増強が知られるIL4,IL5などのサイトカインや接着分子などの添加培養を試みた。
- 無血清培養上清よりの精製抗体作成を試みた。
- 慢性感染細胞および潜伏感染細胞OM10.1, U1, ACH2などの反応性を検討した。
- 無血清培養上清中抗体を用いて、HIV実験室株での抗HIV活性を検出できた。
- * 抗Nef-IgM抗体2C8および3B4Bは、患者末梢血CD4細胞を用いたHIV増殖拡大実験系において、HIV抑制効果が得られるかの予備的検討を開始した。

Effect of anti Nef-IgM Monoclonal Antibody to Propagation of HIV-p24 in MOLT4-MOLT4/IIIIB mixed Cultivation



Anti-HIV-1 effect of anti Nef -IgM Abs is Not Complement dependent ?



HIV-1感染細胞に反応する抗Nef-IgM抗体のエピトープ解析

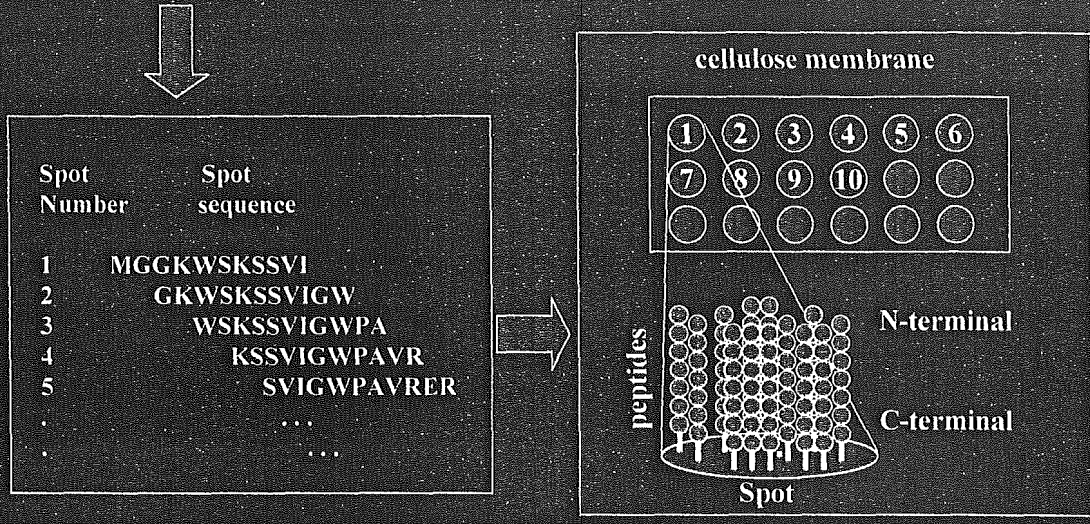
抗Nef-IgMモノクローナル抗体

クローン名	CF8	ヒト抗体
	3B4B	ヒトH鎖、マウスL鎖のキメラ抗体
	E9	マウス抗体 (Dr Y Fujiiより分与を受けた)

- ペプチドアレイ法を用いて、3種のIgM抗体の反応するエピトープ解析を行った。
- その結果、反応エピトープとして新たな主要ペプチド部位が同定された。
- 主要なエピトープペプチドを作製して、HIV-IIIB感染細胞での反応阻害実験を行い反応エピトープであることを確認した。
- 主要エピトープのHIV-Nef strain間でのペプチドシーケンスを比較検討し、感染者におけるNefに有用なエピトープペプチドを検討し決定する。
- * 主要なエピトープペプチドを用いて、高反応性の抗Nefヒト抗体を作製し、HIV感染細胞および潜伏感染細胞に対する排除能力を検討し、HIV-1感染に特異的なIgM抗体治療剤を開発する。

Peptide array (11mer) of HIV-III B Nef

MGGKWSKSSVIGWPAVRERMRRRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSN
 TAANNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEK
 GGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW
 CYKLPVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDSR
 LAFHHVARELHPEYFKNC



HIV-1感染細胞に反応する抗Nef-IgM抗体のエピトープ解析(ペプチドアレイ法)

E9
3B4B
CF8

1 MGGKWSKSSVIGWPAVRERMRRRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAA 50
 RERMRAE

Dr A Iwamoto's

Net3B57J Net3B90I

E9
3B4B
CF8

51 NNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGL 100
 WLEAQEEEEV

Net3B111T

E9
3B4B
CF8

101 IHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLPVPEP 150
 TQGYFPDW
 WIYHTQ DWQNYT
 DWQNYTPG

Net3B177J

E9
3B4B
CF8

151 DKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHP 200
 EVLEWR

Dr Y Fujii's

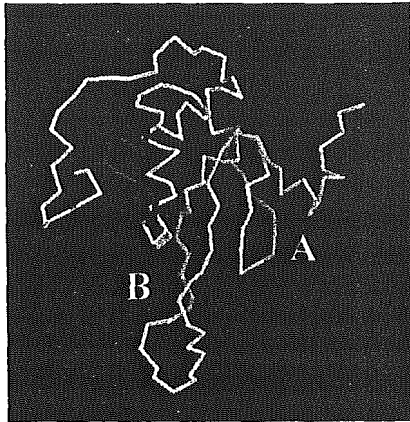
E9
3B4B
CF8

201 EYFKNC 206

E9
3B4B
CF8

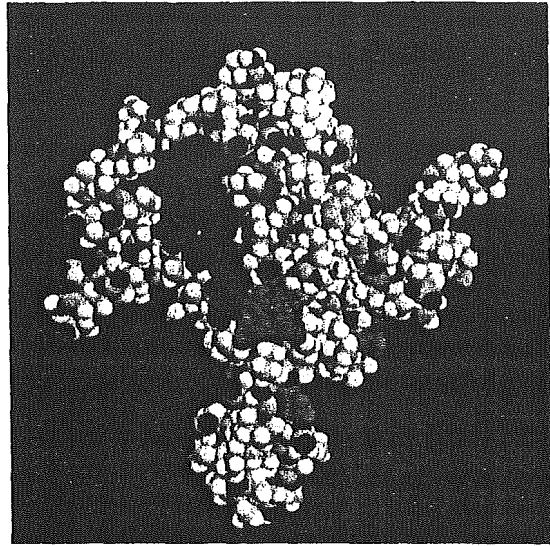
Blue under lined:高変異部位を示す

CF8: 抗Nef-IgM抗体の反応エピソード部位 (3次元解析モデル)



A: 123-130aa (Green) DWQNYTPG
B: 179-130aa (Green) EVLEWR

Blue: 90-99aa Dr A Iwamoto's



中間評価のコメントへの対応について

評価: IgM抗体を用いた治療戦略として期待したい!

推進: 潜伏感染細胞にアポトーシスを誘導する2G9は?

2G9は抗体の精製後の保存安定性が極めて悪く、検討を続行することが困難な状況にある。これを解決すべく、遺伝子導入改変技術などを用いて、安定性の高いリコンビナント2G9の作成を進めている。

疑問: 安全性に大きな疑問がある!

IgM抗体の実用化が成功している例はない。開発に困難を伴うことは予測範囲といえる。

9F11抗原はHIV遺伝子産物ではなく、白血球の分化抗原の1種であり、HIV以外の刺激により発現誘導が起こるので、その使用には注意が必要となることが予測される。2G9抗原は特殊な糖鎖と推察されており、検討された範囲においてHIV感染に高い特異性を示す。

CF8はNefに対する抗体であるので、最も安全に使用可能な抗体であり、その開発推進を最も期待している。

改善: 研究の進捗状況が遅い!

HIV感染患者血液入手のための倫理委員会などの承認に手間取った。さらに解析に必要な十分量の血液の入手は依然困難であり、定期チェックで使用した残余の血液を用いての培養実験を行っているために、HIV解析の効率が悪く苦慮している。また、IgM抗体の不安定性の問題解決に時間を要したが解決されつつある。

疑問: 9F11抗原の実態は何か?

SWAP-70分子が同定された。SWAP-70はB細胞やマスト細胞で発現が認められている細胞質内蛋白であり、シグナル伝達に関与することが知られている。HIV感染により発現誘導され、抗体で認識されるようになるが、ATL細胞ではSWAP-70抗体と反応しない。30kD分子との異同に関しては解決すべく検討中である。

改善: C5aアナフィラトキシン制御ペプチドは本研究に関係がない!

IgM抗体は強力な補体活性化を誘導して感染細胞およびウイルス粒子の破壊を引き起こし、抗HIV効果を発揮する。補体反応のメインストリームは感染排除において極めて重要である。しかし、SIV感染サルでの経験からも、抗体治療を実際に組み立てる上で、アナフィラトキシンC5aの制御は極めて重要であると考えらるに至って居る。

Summary : Characterization of Human IgM monoclonal Antibodies
which react with HIV-1 infected cells

Clone name	Established from	Recognized antigen	Effective dose	Effective target	Mechanism
L55	PBL from melanoma patients (by Dr RF Irie)	GM2	25 ug/ml	Infected cells Virions	Complement mediated lysis
9F11	TC mouse immunized by infected cells	SWAP-70 Others ?	0.1 ug/ml	Infected cells Virions Adult Tcell Leukemia (ATL)	Complement mediated lysis
2G9	TC mouse immunized by infected cells	Unknown	10 ug/ml	Infected cells Latantly infected cells (OM.10.1)	Apoptosis
CF8	KM mouse	Nef	5 ug/ml	Infected cells Latantly ?	Complement mediated Apoptosis ?

huIgM-HIV

抗HIV効果を期待される ヒトIgMモノクローナル抗体の検討

文献

Wolbank S. et al (Austria) J Virol. 2003. 77: 4095-4103
Characterization of human class-switched polymeric anti-HIV-1 antibodies 2F5 and 2G12.

IgGタイプをIgM,IgAにすると中和活性が増強される。粘膜侵入に有効。
特に、2G12(mannose依存性V3-V4 loop認識)IgMはwide rangeに有効。

Cao C. et al (Florida) DNA Cell Biol. 2004. 23: 836-841
Characterization of a novel human anti-HIV-1 gp41 IgM moAb C37.
LTNP末梢血リンパ球よりhybridomaを樹立(gp160AA621-626(DDIWNN)を認識)。

本研究課題のまとめと考察



ヒトIgMモノクローナル抗体をHIV感染症の新しい治療法とするための検討を行った。

HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgM抗体産生ハイブリドーマを樹立し、9F11, 2G9, CF8抗体を選別して抗HIV活性を解析した。

* 2G9抗体は臨床材料で抗HIV活性が検出されたが、抗体安定性が低く、継続的な解析が困難であった。⇒ ⇒ ⇒遺伝子改変抗体技術によるリコンビナント2G9を検討中。

* 9F11抗体は抗体安定性に優れ、感染者末梢血リンパ球を用いるex vivo実験系において、高い抗HIV活性が確認された。

SIV感染細胞での反応性も確認されたので、抗体投与によるin vivo実験を行った。

9F11抗体の補体活性化による過剰のC5aアナフィラトキシン産生によるショック発症が観察された。⇒ ⇒ ⇒ IgM抗体治療においては、特にC5a制御を視野に入れることが重要。

* CF8はHIV遺伝子産物Nefに対する抗体である。反応エピトープも低可変領域であることが確認された。特異性に優れるので安全に適用できる抗体であり、抗HIV活性が確認された。
⇒ ⇒ ⇒感染者HIVに対する抗HIV効果を検討中。

* IgM抗体によるHIV感染症治療の問題点を解決しつつ、安全で有効なIgM抗体の検討開発を進めたい。

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 感染細胞に反応するヒト 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医学研究科 助教授)

共同研究者:金田 次弘((独)国立病院機構名古屋医療センター
血液免疫研究部 部長)

共同研究者:岡田 秀親(福祉村病院長寿医学研究所 顧問研究員)

共同研究者:飛沢笑山(神戸市環境保健研究所 研究職員)

研究協力者: 金原紀章、朝井鈴佳、宮本みずゆ、土肥名月

研究要旨 HIV 感染細胞に反応するヒト IgM 抗体は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、SWAP-70 を新たに同定した。SWAP-70 は B 細胞中において抗体遺伝子に作用してそのクラススイッチに機能する分子として同定され、マスト細胞における IgE 分泌に関与する事が知られている。そこで、HIV 感染細胞での発現動態を検討し、感染により SWAP-70 分子が発現誘導されること、および細胞膜表面に分子の一部を表出する事などを見だし、HIV 感染のひとつのマーカーと成りうる事を検証した。また、9F11 抗体は HIV 感染細胞では 30kD とも反応するのでその異同を確認すべく細胞分画の affinity 精製を行い、N-末端アミノ酸解析を継続的に行った。抗 Nef 抗体 CF8 および 3B4B クローンの無血清培養化や抗体産生法をかくりつした。さらに、これらの IgM 抗体が HIV 持続感染細胞に対して抗 HIV 活性を示す事を明らかにした事より、これらのヒトモノクローナル IgM 抗体の HIV 治療への有用性が示された。

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(9F11 抗体など)を作成することができた。これらのヒト IgM 抗体は HIV 感染細胞に補体と共に働いて細胞障害を起こす。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、HIV ウィルス特異的抗原である Nef に対するヒト IgM 抗体(CF8 など)を作用させたときの効果も検討する。患者末梢血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