

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。

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クローニングを行い、得られた該当抗原分子 SWAP-70の完全長のcDNAを用いてリコンビナントSWAP-70蛋白質を作成精製する。リコンビナントSWAP-70をウサギに免疫して作成したポリクローナル抗体を用いて、HIV感染細胞などでの発現状況を解析する。

9F11抗体アフィニティーカラムなどを用いて9F11抗原の高度精製を行い、30kD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やMASS解析などにより抗原分子の特定を行いSWAP-70分子との異同を検討する。

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。サルSIV感染実験系においても、抗原分子の発現様態が同様であるかの比較検討を組織学的および細胞レベルにて行い、サルSIVを用いた実験データの検討を評価する。

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。

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。

(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 SWAP-70 の cDNA がクローニングされた。cDNA よりリコンビナント SWAP-70 で作成した。リコンビナント SWAP-70 でウサギを免疫してポリクローナルウサギ抗 SWAP-70 抗体を作製した。この抗 SWAP-70 抗体を用いて各種の細胞や HIV 感染細胞での反応性を FACS 解析にて検討した。その結果 HIV-III B や HIV-MN 感染細胞膜上での抗 SWAP-70 抗体の反応性が確認された。SWAP70 は細胞質内蛋白であり、B 細胞等の活性化シグナルにより、細胞膜直下に移行した後に、核内にて抗体遺伝子に作用する事が知られている。今回、我々は SWAP-70 が HIV 感染によりその遺伝子発現が誘導され、発現した SWAP-70 蛋白は細胞膜面上にその一部を表出するという新たな局在を示すことを突き止めた。これらの結果より、

SWAP-70 が T 細胞における HIV 感染のひとつのマーカーとなることが明らかとなった。

SWAP-70 分子は 70kD であるが、9F11 抗原は細胞溶解液中ではウェスタンにて 30kD をしめしているの、この 30kD の細胞膜上 9F11 抗原を細胞膜より高度にアフィニティー精製して N 末端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。さらに、MS 解析を進行中である。

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 病態を呈するサルに 2 mg/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行った実験の組織および血漿、胸水サンプルを京大より入手した。これらのうちで、9F11 抗体投与後に死亡したサルの組織や血漿を用いて、C5a、MIF、HMGB1 レベルを測定した。血漿中で、C5a レベルは測定されなかったが、胸水中では高値を示した。MIF 値は、SIV によるエイズ病態末期において高値を示している事が判明した。IgM 抗体投与により、血漿中 MIF 値が上昇する事はなかったが、投与後死亡したサルの胸水では、高値を示した。HMGB1 値は胸水で高値を示し、IgM 抗体投与においては全て検出限界以下であった。

SIV 感染サルの各臓器の組織標本での検討により、IgM 投与後に死亡したサルの肺および肝臓では、アナフィラキシー

特有の、強い鬱血および浮腫が認められた。

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、この現象もアナフィラキシー症状の発現に関与している可能性もある。この過剰補体活性化反応に伴う強度の炎症症状誘発を制御するためにはアナフィラトキシン C5a の活性制御が重要である。

HIV 遺伝子産物である Nef に対する IgM 抗体である CF8 抗体及び 3B4B 抗体のクローンを樹立し、無血清培養法を確立出来た。これらの IgM 抗体の添加培養における HIV 感染拡大実験において、培養上清中 P24 の抑制効果が認められた。

D. 考察

9F11 抗体の抗原遺伝子として SWAP70cDNA をクローニングしたので、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。

9F11 抗体を SIV 感染サルに静脈内投与した実験の原因の解明を行った結果は、IgM 抗体投与による、過剰補体反応活性化による、炎症反応性アナフィラキシーであると結論された。IgM 抗体はその分子量が 900kD と大きく、皮下投与等による血管内移行の効率がよくないため

に、治療として投与する場合には、直接血管内投与が第一選択肢となると予測されるので、IgM 抗体を治療剤として考える上では、補体反応の同時制御の適応を行う事が、極めて重要であると考察された。

HIV 感染細胞排除において抗体治療を組み立てる中で、HIV に対する特異性は極めて重要な要素であり、HIV 遺伝子産物である Nef 抗原を標的として作成した抗 Nef-IgM 抗体の抗 HIV 活性が確認された意義は大きいものと考えている。

E. 結論

1 9F11 抗体の抗原分子として同定された SWAP-70 は、HIV 感染に伴い T 細胞に発現誘導されて膜面上に表出され、抗体で検出可能と成るので、HIV 感染におけるひとつの新たなマーカー抗原として応用が可能である。

2 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 抗体に限らず、抗体医療や、免疫複合体病態の軽減に有用な改善治療法として応用できることが重要である。

3 抗 HIV 活性を示すヒト抗 Nef-IgM 抗体 CF8 の AIDS 治療における有用性が期待できる。

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。

ある。

G. 研究発表

論文発表

- 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:

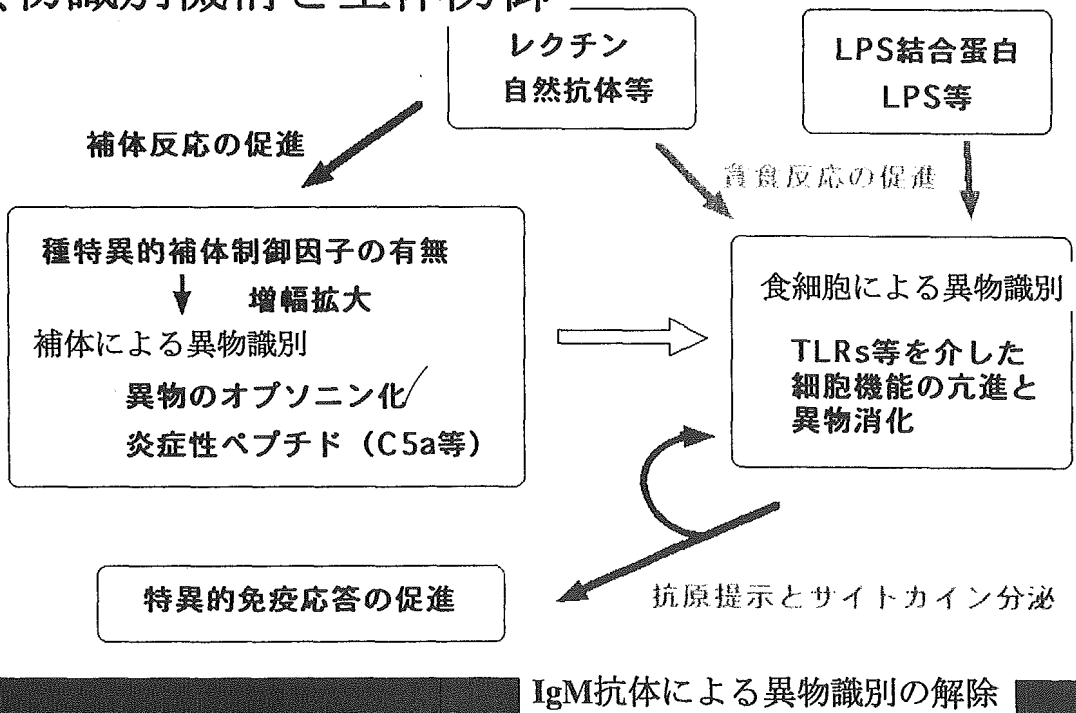
- 1344-1351, 2005.
- 7) 岡田則子 HIV 感染症におけるヒト IgM 抗体療法の可能性—抗体医療の最前線— 第257回 CBI 学会研究講演要旨集 257:2 (2005)
 - 8) 岡田則子 HIV 感染症におけるヒト IgM 抗体の研究 第16回日本生体防御学会抄録集 16:47 (2005)
 - 9) Noriko Okada Human IgM monoclonal antibodies which recognize and eliminate HIV-1 infected cells. In: Elimination of HIV-1 latently infected 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 eroxisomeproliferator-activated receptors. *AIDS*, 18: 1-10, 2004. .
- 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 2 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)

HIV感染症におけるヒトIgM抗体の研究

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学

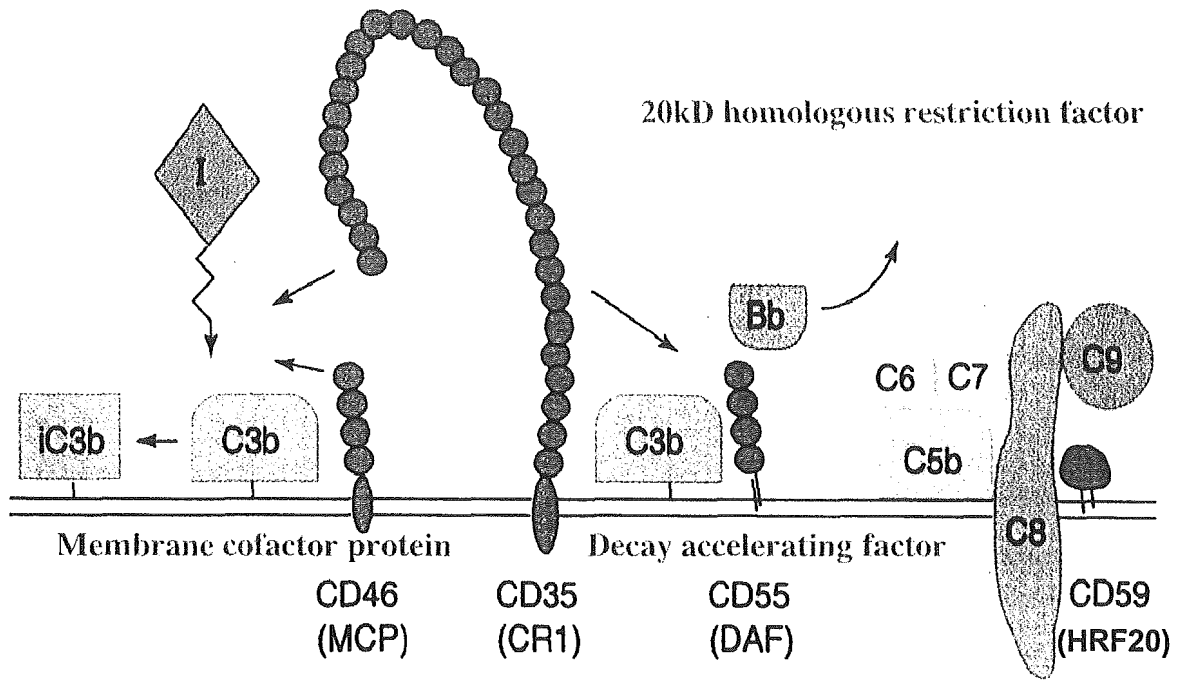
岡田則子

異物識別機構と生体防御



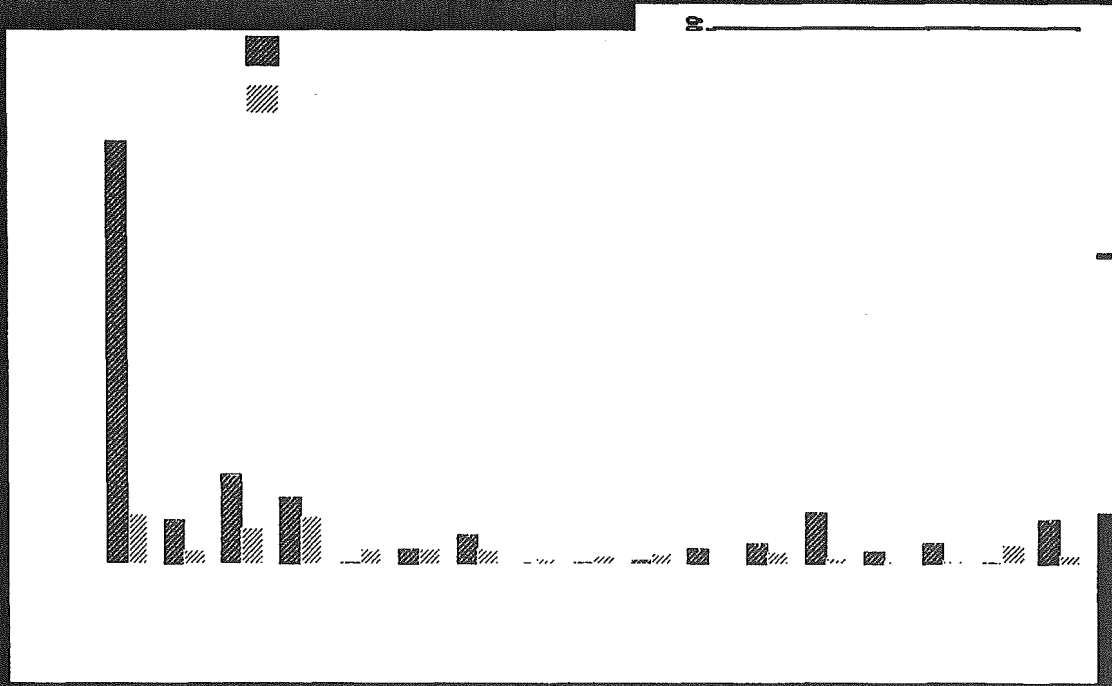
種特異的補体制御膜因子

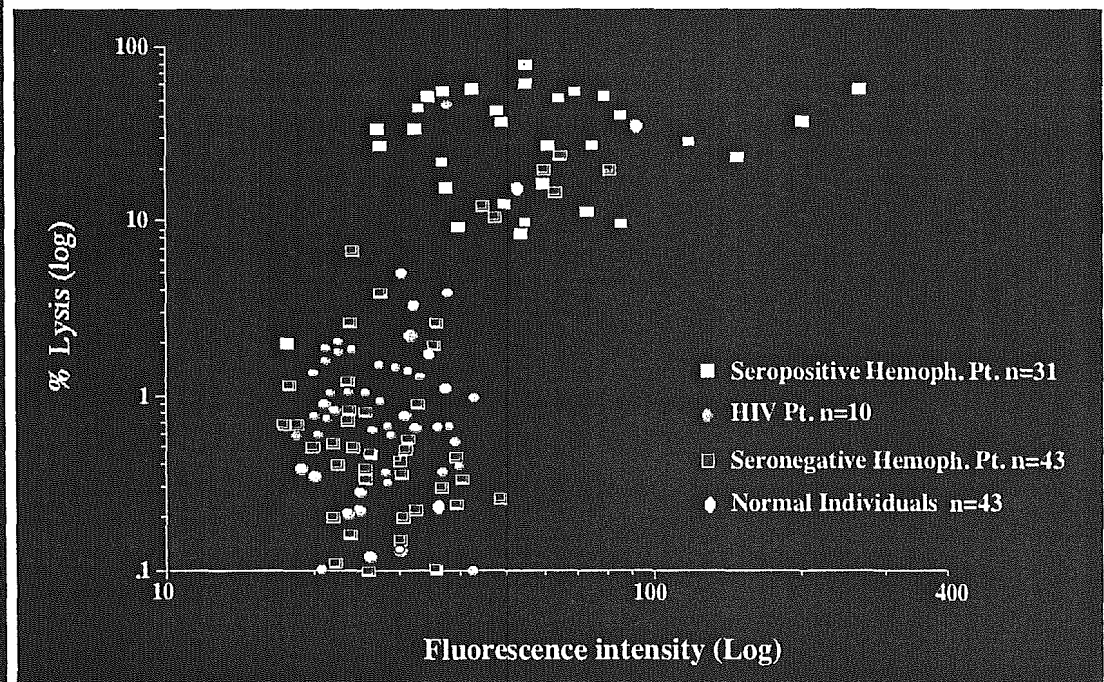
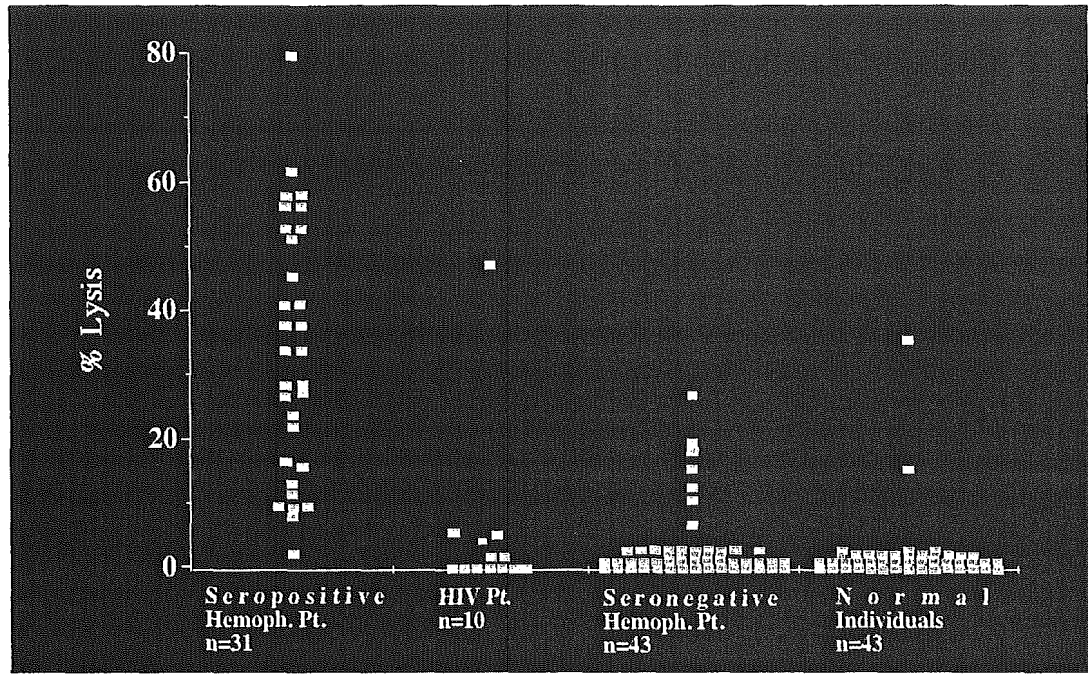
Functions of membrane-bound complement regulatory molecules

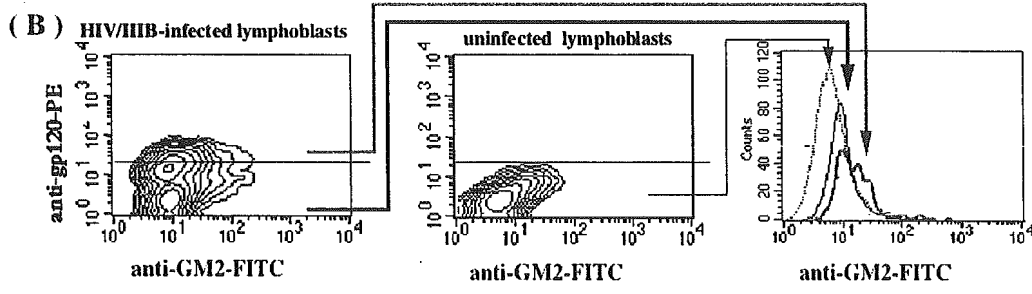
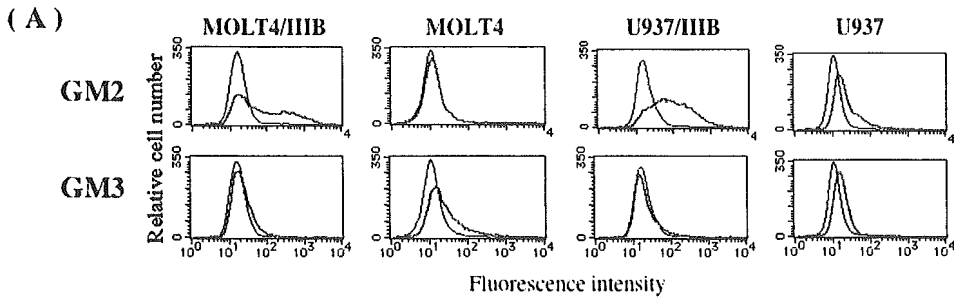


c

Cytolysis of HIV-1 infected cells by human serum from a healthy individual

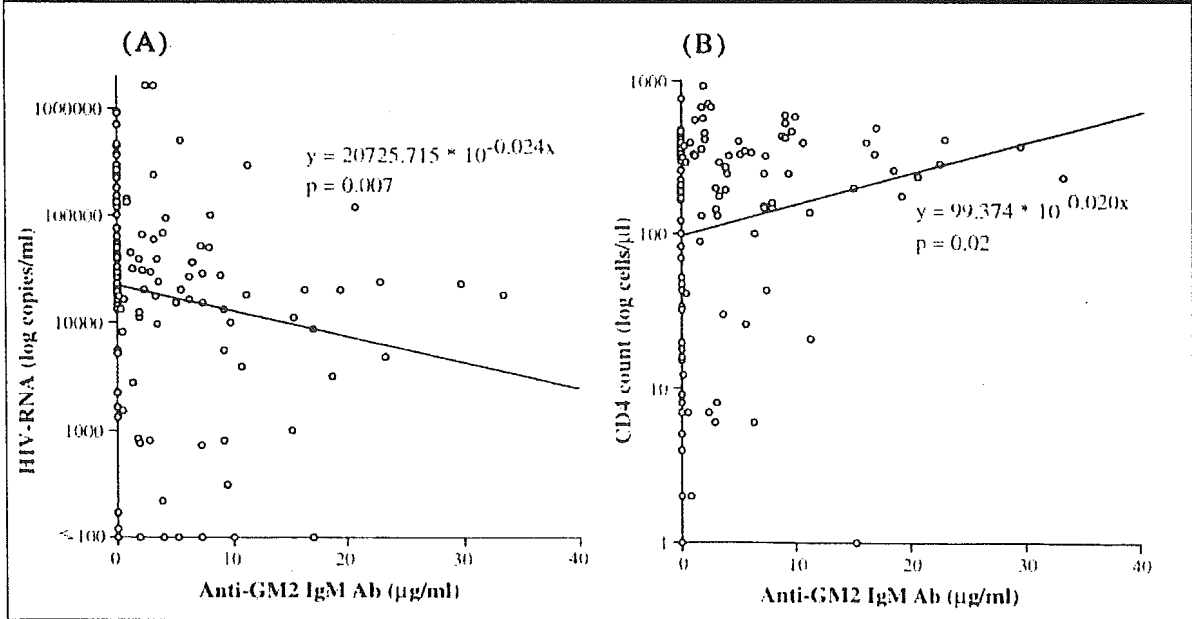






Correlation between IgM antibody level to GM2 and HIV-1 load

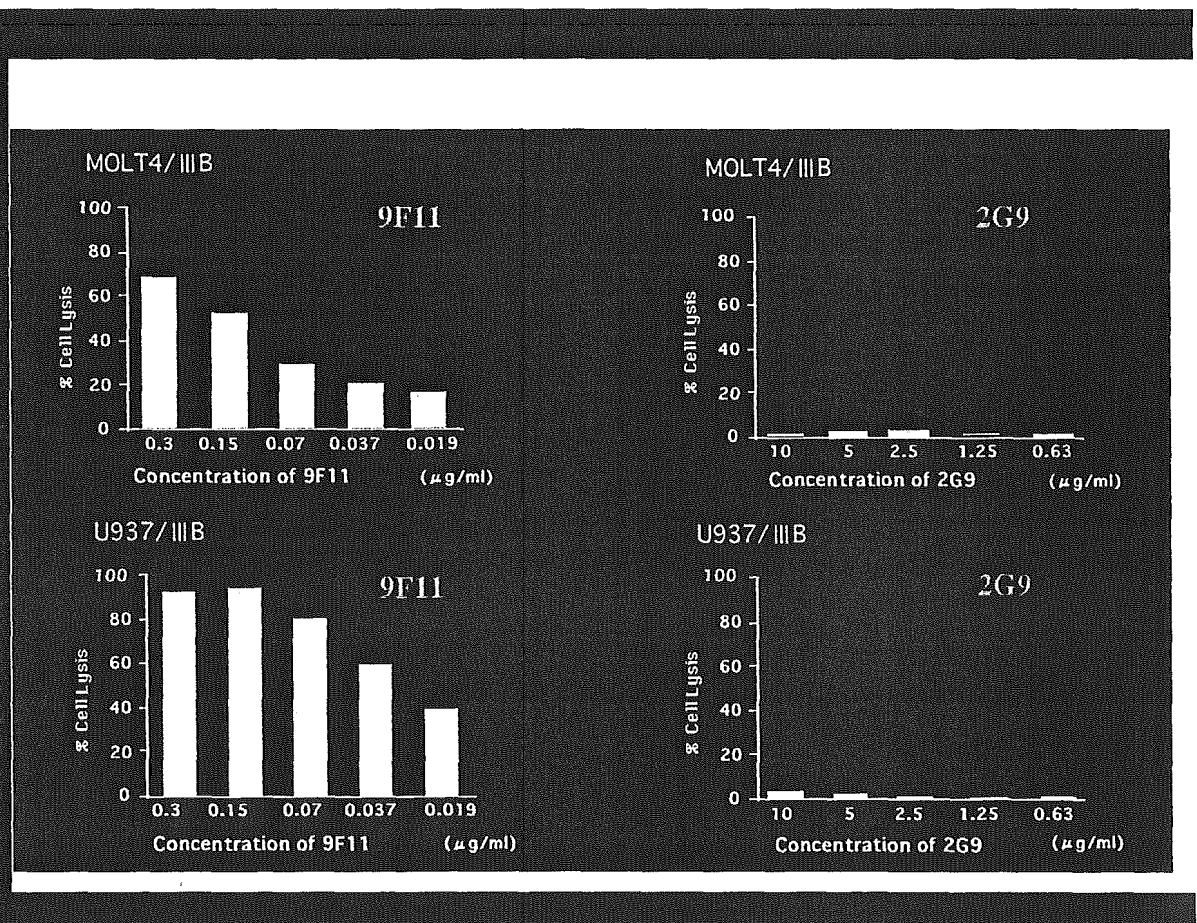
Correlations between Anti-GM2 IgM Ab, HIV-RNA and CD4 counts



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	P70 Unknown	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	?	?	?

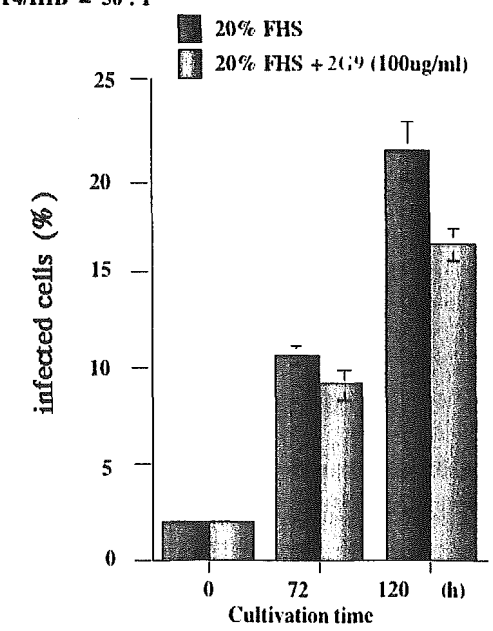
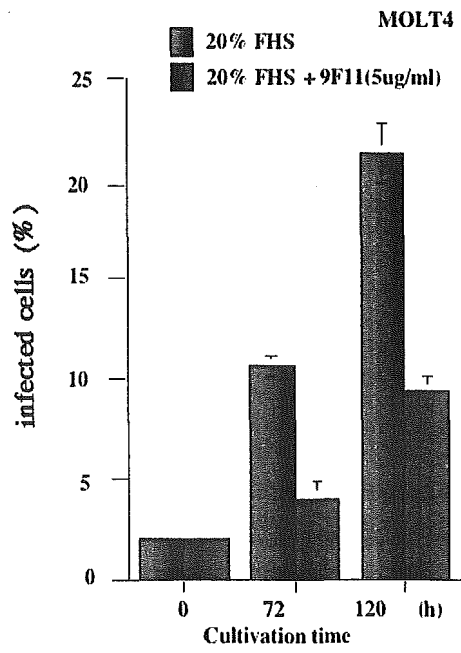
hu-IgM-HIV



```

+++++++L          FL  +L  GV  VQL  SG  GLVKP  L  L  CA  SG  S  S  W  RQ
-                +--- - +++-  ---  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -
P  GLEW        S  Y  YA  SVK  R  TI  D  KN  LQ  NS  EDTAVYYCAR        WGQGTLTVSS
-            -  +
-----
GSASAPTLFLPLVSCENSPSOTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDLSSTRGFPSVLRGGKAAATSQVLI PSKDVMQGTDEH
-----
VVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAEILPPKVSVFVPPRDFEFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVSGSVTTDQVQAEAKE
-----
SGPTTYKVTSTITIKE SDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVDPQDTAIRVFAIPP SFASIFLTKSKLTCLVTDITTYDSV
-----
TISWTRQNGEAVKHTNISESHPNATFSAVGGEASICEEDWNSGERFTCTVTHHDLPSPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQ
-----
LNIRESATITCLVTGFSPADVFVQWQMQGQPISPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHFALPNRV
-----
ERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCYPCWPAHKLGAAGRSVCAF
-----

```



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晚反応後、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抗体のSIV感染サルリンパ球細胞に対する反応性

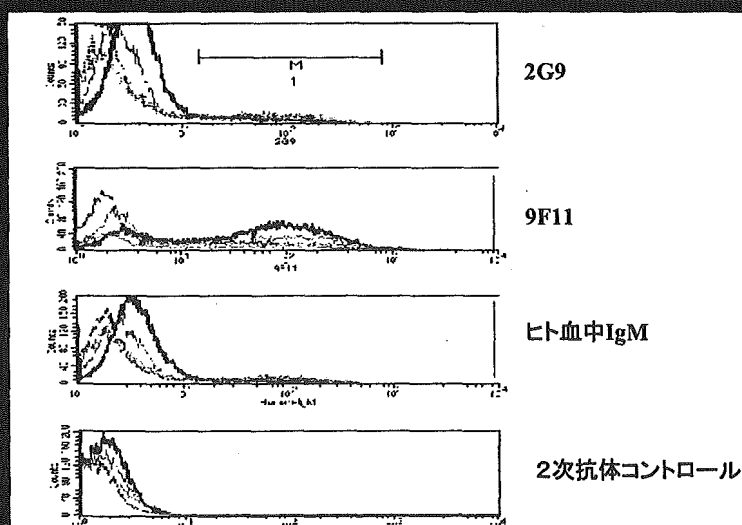
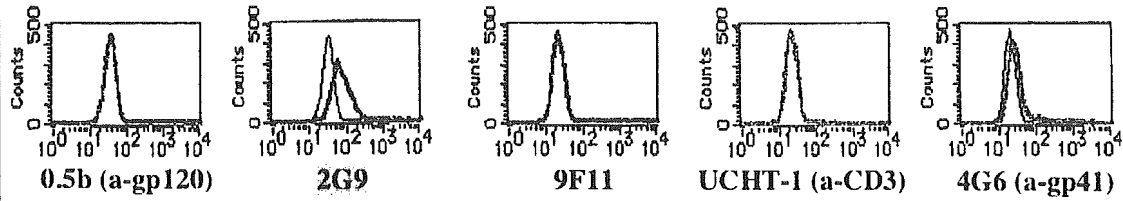
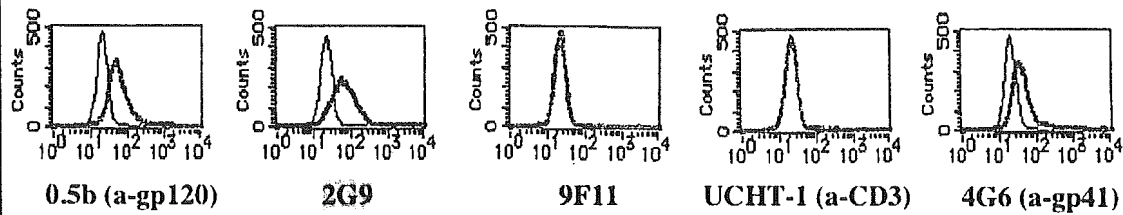


Fig. 4. Affinities between 9F11s (anti-CD45) and PBMCs from SIV-infected monkeys.

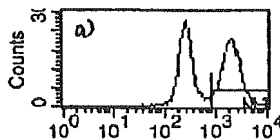
A. OM10.1



B. OM10.1 with 1 ng/ml TNF-a for 10 days

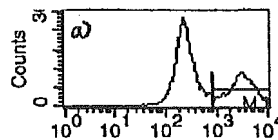


PBS for 48 hrs



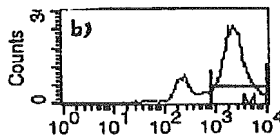
Marker	% Gated
All	100.00
M1	50.09

2G9 (12.5 ug/ml) for 48 hrs



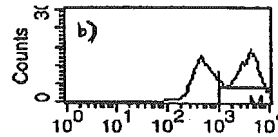
Marker	% Gated
All	100.00
M1	33.51

PBS for 72 hrs



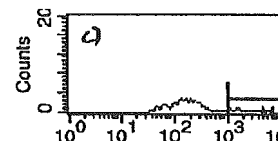
Marker	% Gated
All	100.00
M1	78.89

2G9 (12.5 ug/ml) for 72 hrs



Marker	% Gated
All	100.00
M1	57.27

2G9 (50.0 ug/ml) for 72 hrs



Marker	% Gated
All	100.00
M1	12.09

KC57(anti p24) -FITC

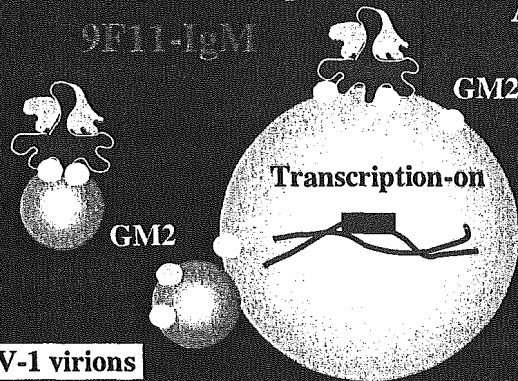


Human IgM Antibody effective to HIV-1 infection

Anti-GM2 human IgM Ab

plus Complement

9F11-IgM

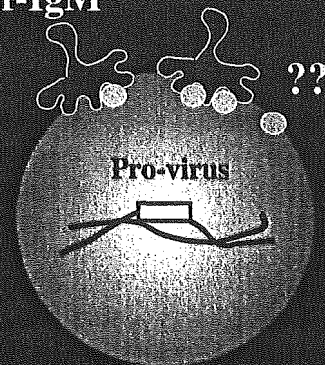


HIV-1 virions

Complement-mediated lysis

HIV-1 infected cells

Anti-Nef-IgM



Latently infected cells

IgM therapy

Acknowledgements

- Nagoya City Univ Grad Sch Med Sci Dep Biodefense
- John Weyne Cancer Institute
- Tokyo Univ Grad Sch Inst Med Sci Dep Infect Diseases
- Kyoto Univ Grad Sch Inst Virol
- National Hospital Org Nagoya Med Center



9F11 抗原の解析

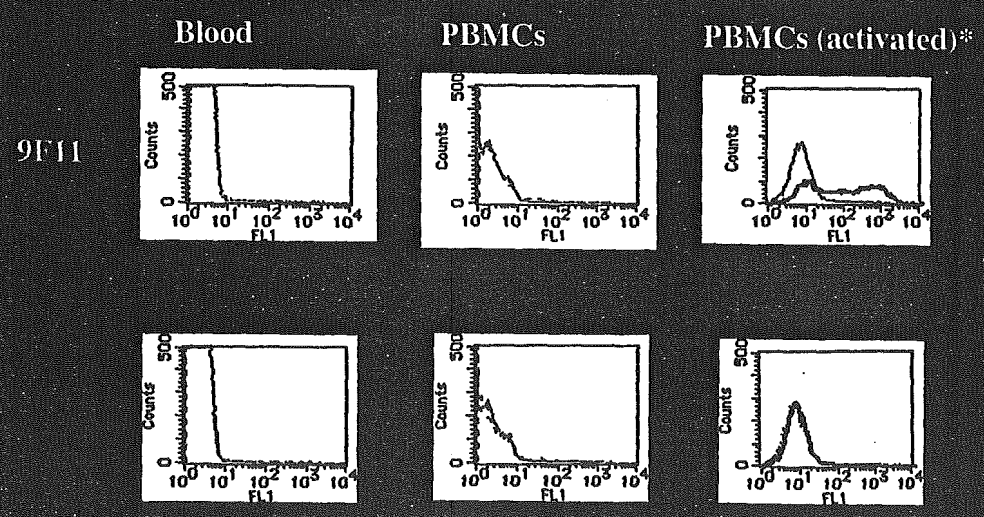
名古屋市立大学大学院医学研究科

金原紀章、朝井鈴佳、土肥名月、岡田則子

福祉村病院長寿医学研究所

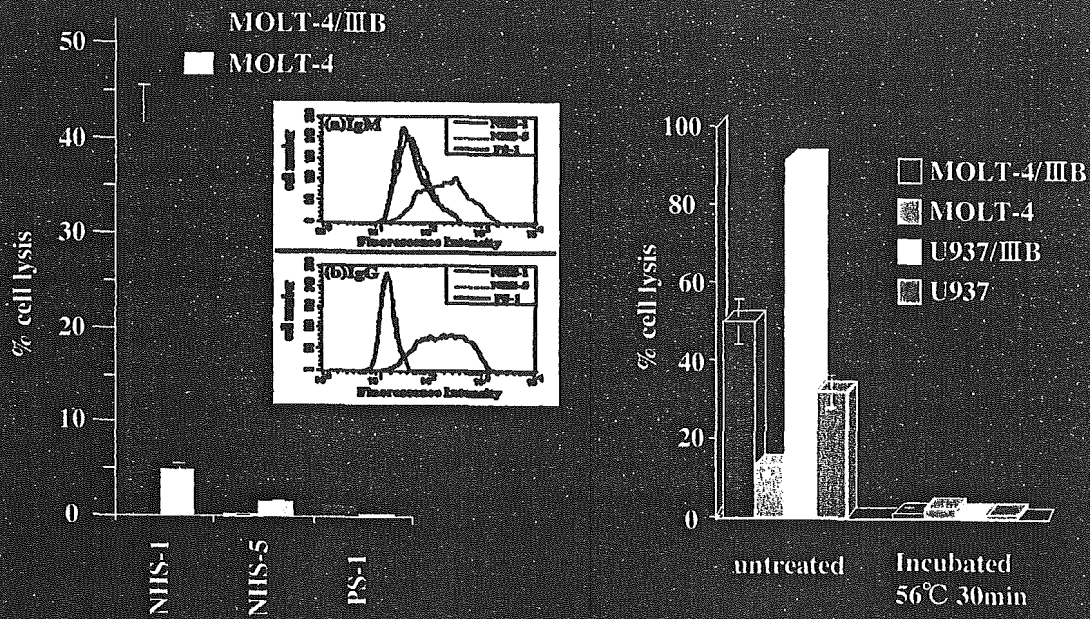
岡田秀親

Reactivity of 9F11 and 2G9 on human PBMCs

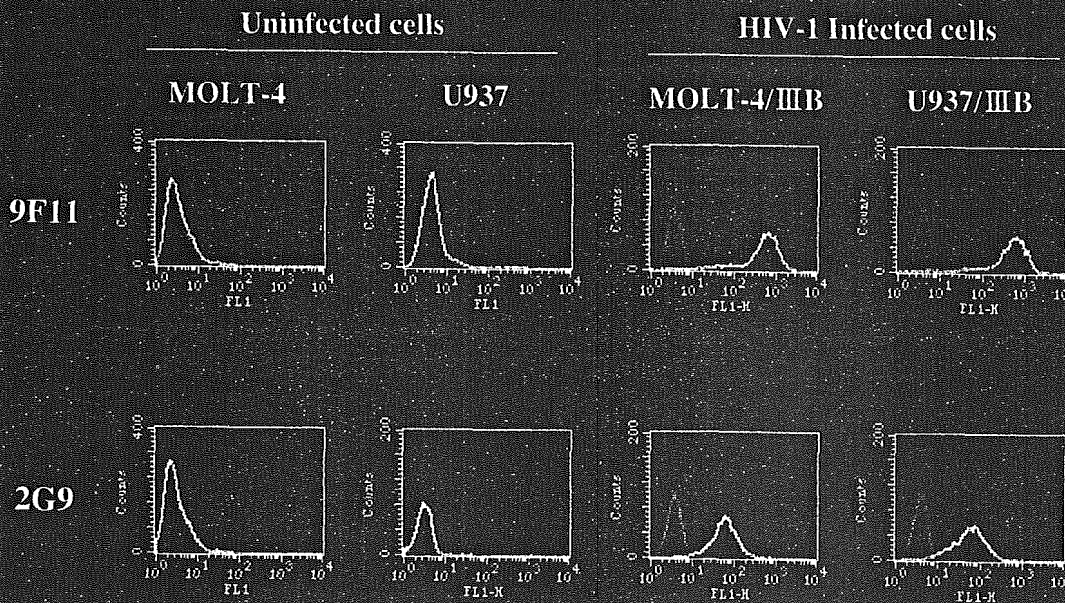


* PBMCs were stimulated by 2 μg/ml PHA for 7days.

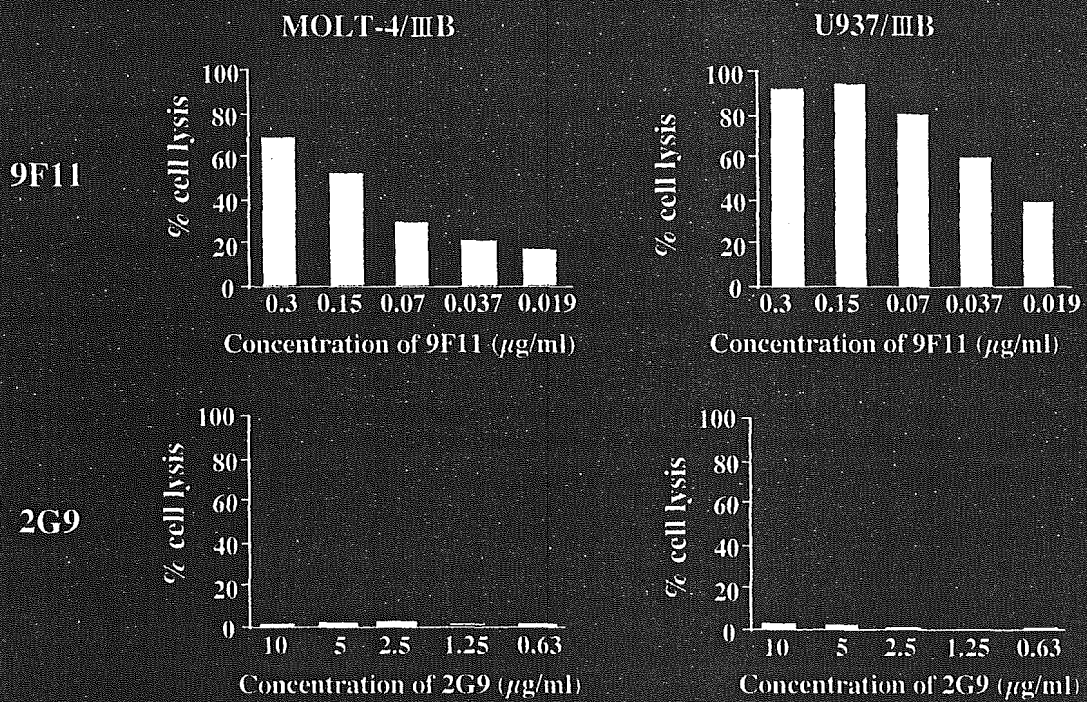
Complement-dependent cytolysis of HIV-infected cell by human serum



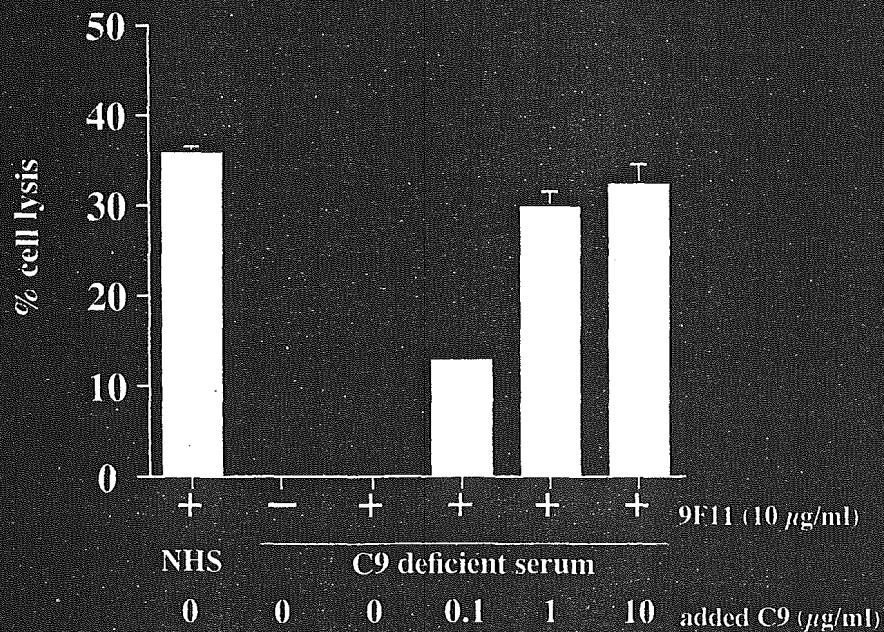
Reactivity of 9F11 or 2G9 on HIV-1 infected cells



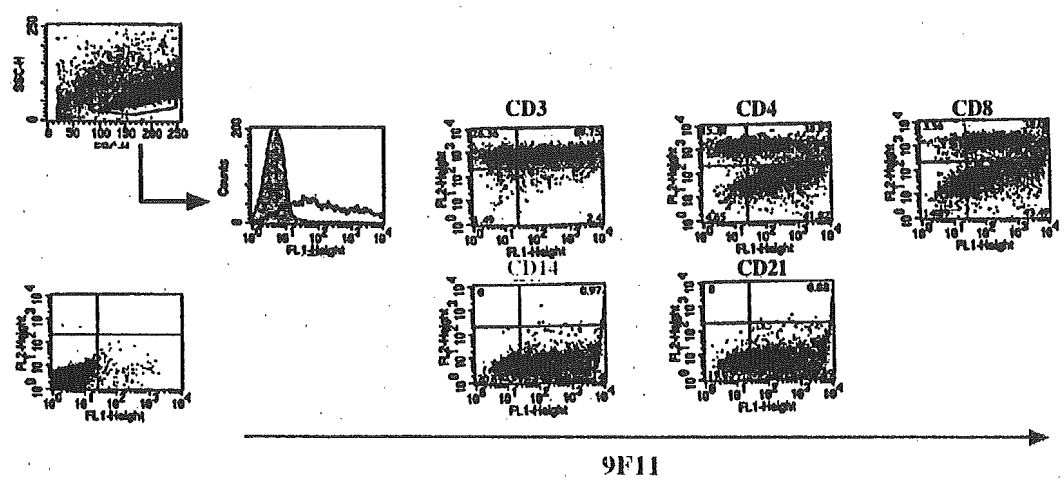
Complement-dependent cytotoxicity of 9F11 or 2G9 on HIV-1 infected cells



9F11 cytotoxic activity on MOLT-4/III B with C9 deficient serum

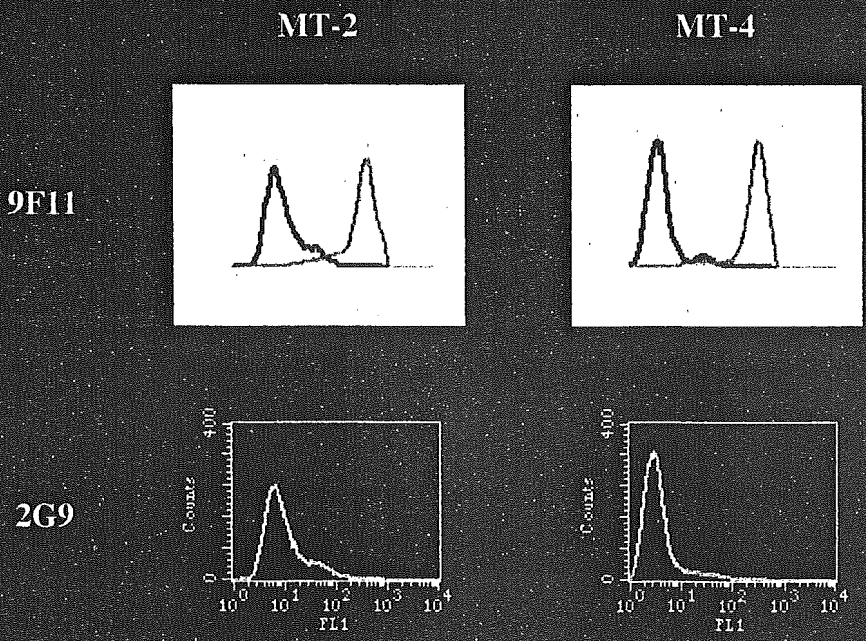


Reactivity of 9F11 on each cell fraction in PHA stimulated PBMCs

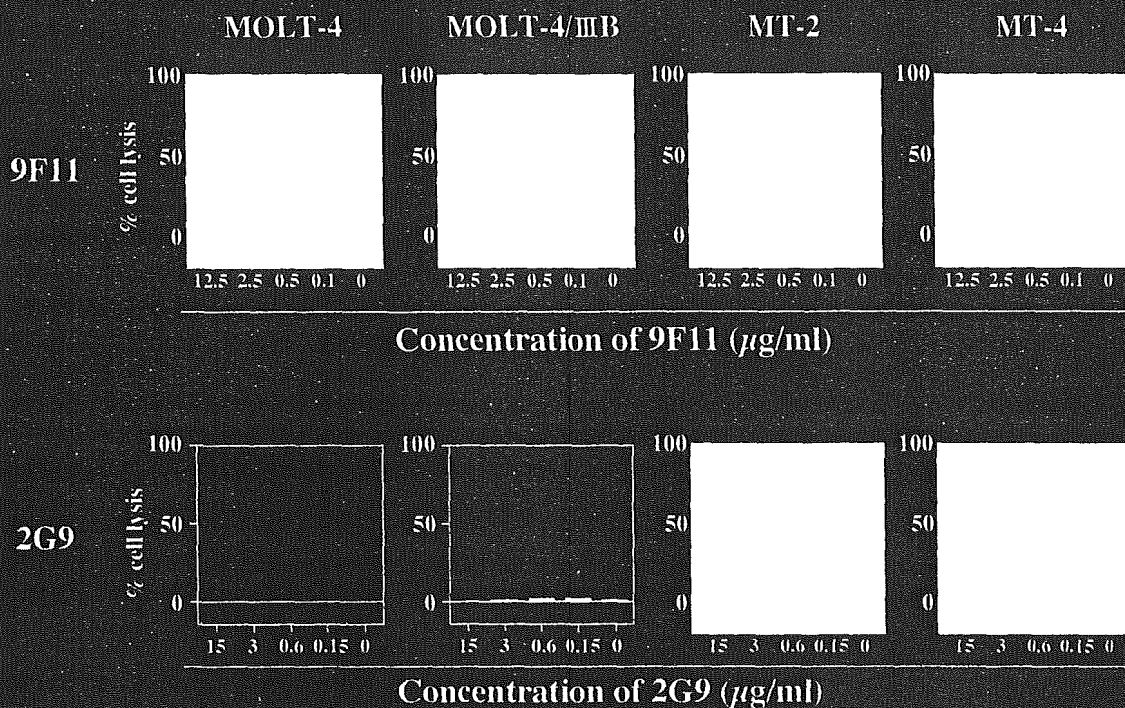


PBMCs were stimulated by 2 ug/ml PHA-P for 7 days.

Reactivity of 9F11 or 2G9 on HTLV-1 infected cell line



Complement-dependent cytotoxicity of 9F11 or 2G9 on MT-2 and MT-4



Method of ^{51}Cr release assay

Cell count (1×10^7 cell)

↓

Add 1mCi/ml ^{51}Cr solution

↓

incubate for 90 min at 37°C

↓

Wash with PBS, 2times

Suspend cells in GVB buffer (6.7×10^5 cell/ml)

Distribute cells 30 μl /well (2.0×10^4 cell/ml)

↓

Add 20 μl /well FHS and 50 μl /well antibody

↓

incubate for 90 min at 37°C

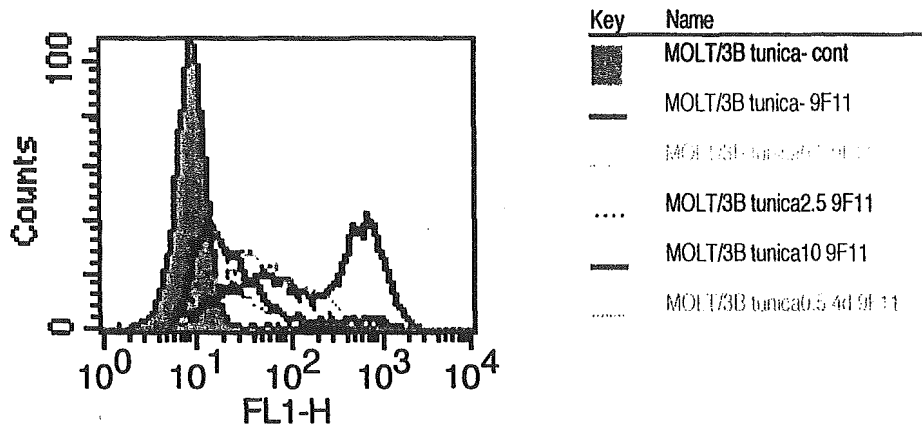
↓

Centrifuge

Sampling of supernatant (50 μl)

Measure ^{51}Cr

Decreased reactivity of 9F11 to MOLT4/IIIB cultivated with Tunicamycin



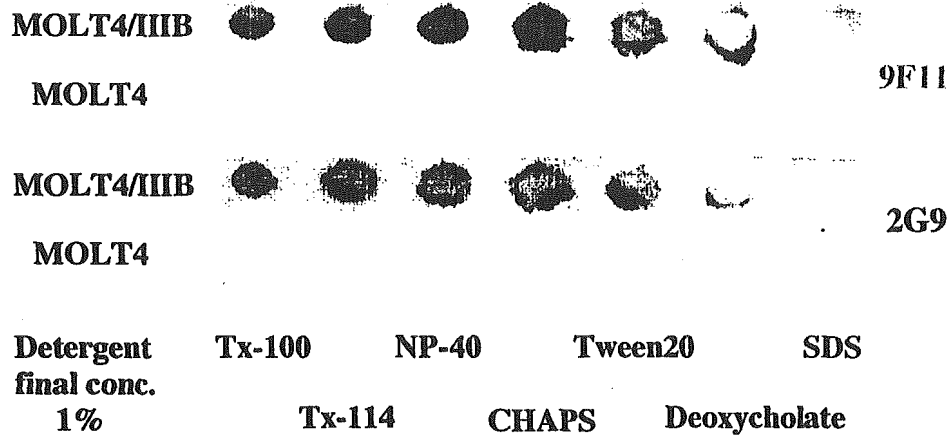
MOLT4/IIIB cells were cultivated with 0.5, 2.5 or 10 ug/ml Tunicamycin for 2 days, and/or 0.5 ug/ml for 4days.

9F11抗原 (1)



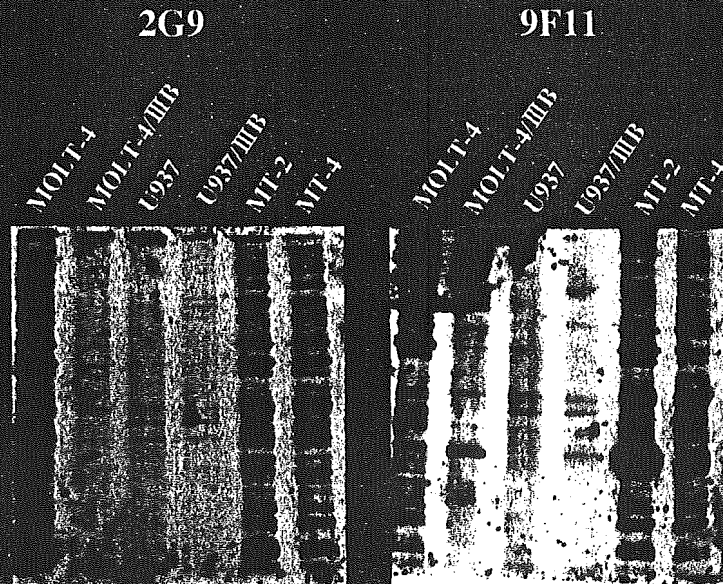
- 9F11はヒト末梢血やPBMCsには反応性を示さないが、PHA刺激7日間培養により、反応性を獲得する。
- 9F11抗原はPHA刺激などにより、リンパ球に誘導発現される、リンパ球分化抗原である。
- 抗原誘導は特に 活性化CD8リンパ球に顕著であるが、活性化CD4リンパ球にも発現誘導される。
- MOLT4/IIIBのProtease処理に対して9F11反応性は抵抗性を示す。
- MOLT4/IIIBのTunicamycin添加培養により9F11反応性は低下するので、N型糖鎖を含む糖蛋白である可能性が高い。

Dot-blot analysis of 9F11 and 2G9 antigens on MOLT4/IIIB



Dot-blot

Western blot analysis of 9F11 antigen



1×10^7 cells
 ↓ 1% CHAPS of 1 ml
 ↓ 2hr rotate at 4°C
 SDS-PAGE (15% Gel)
 (applied 16 μ l)
 Equivalent amount
 1.6×10^5 cells
 ↓
 Western blot analysis

← 30kDa