

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～17年度 総合研究報告書

主任研究者 岡田則子
平成18年4月

目 次

I. 総合研究報告

HIV 感染症の治療開発に関する研究 1

岡田則子

(資料) 患者血液中 HIV 感染細胞の排除に関する研究

(資料) 平成17年度 HIV/AIDS 研究発表資料

(資料) 平成16年度 HIV/AIDS 研究発表資料

(資料) 平成15年度 HIV/AIDS 研究発表資料

(資料) 平成16年日本エイズ学会発表などの資料

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 67

III. 研究成果の刊行物 別刷 71

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

総合研究報告書

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 は極めて効率よく補体反応依存性に感染細胞および HIV 粒子を破壊して抗 HIV 活性を発揮する。その標的抗原の探索を行い、SWAP-70 を新たに同定した。インフォームドコンセントを得た HIV 感染者の末梢血液から分離した CD4 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で反応させた後、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)

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、CF8 など)をキリンビール社から提供を受けた TC マウスなどを用いて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 IgM 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 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。IgM 抗体のヒトへの適用を構築する上で、補体反応に起因する炎症副作用の制御の必要性が想定される。SIV 感染サルモデル実験系での基礎データをもとに、invivo 解析を進めるための炎症抑制ペプ

チド剤の併用による安全性を確保して、ヒト IgM 抗体による新しい HIV 感染症治療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

抗HIV活性を示すヒトIgM抗体9F11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。

インフォームドコンセントを得たHIV感染者の末梢血よりCD4リンパ球を分離する。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やFACS法で解析する。感染者CD4リンパ球での9F11抗原の発現動態を健康人リンパ球と比較検討する。更に、全身での抗原発現状況を把握するためにピオチンダイレクタラベル化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。

感染者リンパ球分画に9F11抗体等のヒトIgM抗体と新鮮ヒト血清を補体源として1晩添加反応させた後、細胞を洗浄して余剰の抗体補体を除去する。その細胞に抗CD3抗体およびIL2の添加して初代培養を行う。Ex vivo 実験により、培養上製中のp24蛋白およびHIV-mRNA量を測定する。さらに細胞中のHIV-DNA量を測定することにより

HIVプロウイルスを保有した感染リンパ球の排除がIgM抗体で可能かを検討する。広範囲の解析を行い、HIVのウィルススクレードや、HAART治療有効例などを指標にして抗HIV効果の評価を行う。

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。

HIV遺伝子産物であるNefに対するヒトIgMモノクローナル抗体(CF8、3B4 Bなど)の検討を行う。これらクローン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効果を検討する。得られたデータをもとに抗HIV効果のメカニズム解析を検討し、HIV特異的HIV治療用IgM抗体剤としての可能性を検討する。

(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 抗体の抗原として SWAP-70 の cDNA がクローニングされた。そこでリコンビナント SWAP-70 を作製精製した。さらにリコンビナント SWAP-70 をウサギに免疫して抗 SWAP-70 抗体を作製した。FACS 解析により HIV 感染細胞膜に SWAP70 が発現していることが確認出来た。しかし、感染細胞溶解液中の 9F11 抗原は 30kD であるので、30kD の 9F11 抗原を細胞膜より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 SWAP-70 との相同性が検出されなかった。

感染者末梢血リンパ球での 9F11 抗原の発現は非感染者のそれと比較して明らかに発現の増強が認められた。しかし、9F11 抗原はリンパ球の PHA 刺激や抗 CD3 抗体添加により発現が誘導された。また、成人 T 細胞白血病細胞においても 30kD の 9F11 抗原の発現が認められた。

HIV 感染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抗 CD3 抗体と IL2 存在下で増殖培養を行い、抗 HIV 活性の検討を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が極めて低い症例が多く存在し、ウイルス抗原を検出できた症例は全体の5%位と低かった。ウイルス産生が検討できた症例の内、35%位の症例で上清中P24が検出限界以下に抑えられた。HIV-mRNA の抑制も検出された。さらに、それらの症例において HIV-DNA 量が激減する症例も確認された。

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 病態を呈するサルに 9F11 抗体を投与した後に死亡した例が存在し、その組織および血漿、胸水を用いて炎症性因子 C5a、MIF、HMGB の解析を行った結果、胸水中で高値を示した。また、組織解析の結果、肺や肝臓に強度の鬱血、浮腫を認め、アナフィラキシー様の症状が観察された。9F11 抗体を HIV 感染 MOLT4細胞に新鮮血清とともに作用させると TNF α を産生させる作用が認められたので、活性化補体による炎症反応増幅に関与する可能性もある。過剰補体活性化反応に伴う炎症症状を制御するために C5a 阻害ペプチドの炎症抑制効果を検討した。

感染細胞や潜伏感染細胞の FACS 解析により検出可能な抗 Nef-IgM 抗体 CF8、3B4B などの反応エピトープ解析をペプチドアレイ法を用いて行った結果、複数のエピトープ候補が検出された。コンサーブ領域に反応するヒト抗 Nef-IgM 抗体 CF8 クローンを用いて、抗 HIV 活性の検討を行った。持続感染細胞株を用いた感染拡大実験系において、CF8 は抗 HIV 活性を示した。

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た。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。患者末梢血リンパ球を 9F11 と補体血清で処理すると約 1/3 の症例において 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て、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. *Virol. Methods* 124, 157-165 (2005).
 - 2) Takahashi, M., Yoshida, M., Oki, T., Okumura, N., Suzuk, 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 *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.
 - 5) 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘 HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビル血中濃度測定法の開発。日本病院薬剤師会雑誌、41, 731-734 (2005).
 - 6) 高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘 カレトラ™投与外来 HIV 感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価。日本病院薬剤師会雑誌、41,

873-876 (2005)

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, VM., 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<吳>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 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)

患者血液中 HIV 感染細胞の排除に関する研究

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）

研究概要

HIV-1 感染培養細胞株に対する殺細胞効果が証明されたモノクローナル IgM 抗体を用い、HIV-1 感染症患者由来の感染細胞、潜伏感染細胞に対しても殺細胞効果が存在するかの検討を行った。患者末梢血から分離精製した CD4 陽性 T リンパ球を対象にして 2G9 抗体を用い、抗体添加培養下で HIV-1 DNA 陽性リンパ球が消失するかの検討を行った。その結果、2G9 抗体は患者由来の HIV-1 感染細胞を標的とした効果を示唆する結果が得られた。次いで、CD4 陽性 T リンパ球における陽性細胞率と 9F11 抗原の分布の検討を行った。免疫組織化学的検討では陽性細胞率は 4~29%（平均 12%）、フローサイトメトリーによる検討では 10.1~44.5%（平均 28.9%）であった。残念なことに健常人 CD4 陽性 T リンパ球でも約 5%に発現が認められた。従って、9F11 抗原は患者検体でその発現が亢進していたが、その特異性は低いと思われる。

A. 研究目的

HIV 感染症/エイズの治療は HAART (highly active antiretroviral therapy) と総称される強力な多剤併用抗レトロウイルス療法により急速な進歩を遂げた。進行したエイズ状態で発見される症例を除けば、短期間で死に至る転帰を辿る患者は激減した。

しかし、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を中心とする HAART に用いられている薬剤は、その作用の性質から HIV-1 の感染を阻害したり、プロウイルスを保持している細胞を根絶する機能を持っているわけではない。即ち、HIV-1 が感染しているヘルパー T 細胞やマクロファージの内、セルサイクルに入っている細胞群は抗レトロウイルス薬の存在下でウイルス産生を抑制された状態で短期間に代謝され死滅するが、休止期に入ってい

る寿命の長い細胞群は簡単には死滅しない。そのターンオーバーには数十年を要すると言われており、ひとたび薬剤が無くなれば再び HIV-1 を産生する。一方、HAART に取って代わることが出来るような新たな治療薬についていえば、遅々とした進捗状況にあるのが現状である。本研究は HIV-1 感染培養細胞株に対する殺細胞効果が証明されたモノクローナル IgM 抗体が HIV-1 感染症患者由来の HIV-1 感染細胞、HIV-1 潜伏感染細胞を殺傷し、排除機能を有するかの検討を *ex vivo* で行うこと目的とした。

B. 研究方法

HIV-1 DNA の定量 : Gag 遺伝子領域の塩基配列が保存された領域に 2 種類の PCR プライマーセットと Taqman プローブを設定し、リアルタイム PCR に先立ち、定量前

増幅を加味した高感度法を用いて定量を行った。

患者末梢血からの CD4 陽性 T リンパ球の精製 : StemSep STS-14052 を用いてネガティブセレクションにより精製した。

CD4 陽性 T リンパ球の培養と生細胞の分離 : 細胞は 10%FCS を含む RPMI1640 メディウムに懸濁後、24 ウェルプレートに細胞密度 10^5 細胞/ウェルの条件で播種した。終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ の 2G9 抗体の添加培養と不添加培養 (コントロール) を $5\% \text{CO}_2$ を含む 37°C インキュベーター中で行った。生細胞の分離は Dead Cell Removal Kit を用いマニュアルに準じて行った。

組織化学

ブロッキング : 10mg/ml normal goat IgG $10 \mu\text{l}$ を添加して室温で 10 分間放置した。

9F11 IgM 抗体の反応 : $2 \mu\text{g/ml}$ の 9F11 抗体を $50 \mu\text{l}$ 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、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 488 labeled goat anti-human IgM (μ chain) $50 \mu\text{l}$ 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 $4\% \text{PFA}$ にて 10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、DAPI II 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。

フローサイトメトリー (FCM) 解析

単核細胞分離 : Ficoll-Paque を用いて単核細胞を分離し、2% FCS 添加 PBS (-) で洗浄後、細胞懸濁液の濃度を約 2×10^7 個/ml

にした。

ビオチン標識 9F11 抗体の反応 : 細胞懸濁液 $50 \mu\text{l}$ にビオチン標識 9F11 抗体 $8 \mu\text{l}$ 、RPE-Cy5 標識抗 CD3 抗体 $10 \mu\text{l}$ を加え、次いで、CD4 解析用には RPE 標識抗 CD4 抗体を CD8 解析用には RPE 標識 CD8 抗体をそれぞれ $10 \mu\text{l}$ 加えて冷暗所で 45 分間反応させた。陰性対照は、細胞懸濁液にビオチン標識 9F11 抗体を加えず、RPE-Cy5 標識抗 CD3 抗体と RPE-マウス IgG1 各 $10 \mu\text{l}$ 加えたものとした。

二次抗体の反応 : 一次抗体とインキュベートした細胞を 2 回洗浄した後、検体および陰性対照に FITC 標識ストレプトアビジン $30 \mu\text{l}$ を加えて、冷暗所で 30 分間反応させた。

固定 : 2 回洗浄した後、 $1\% \text{PFA}$ $500 \mu\text{l}$ を加え、測定まで冷暗所に保存した。

フローサイトメトリー : リンパ球分画をゲーティングし、次いで CD3 陽性 T リンパ球をゲーティングした。その領域内で 9F11 (FITC) と CD4 (RPE)、9F11 (FITC) と CD8 (RPE) をそれぞれ解析した。解析には FACSCalibur フローサイトメーターを用いた。

(倫理面への配慮) HAART によって HIV 感染症のコントロールがかなり有効に出来るようになったが HIV 潜伏感染細胞に対する有効な治療法が未だ存在していないこと、最近、岡田則子等により殺細胞効果が期待できる IgM 抗体が開発されたことを説明し、当該研究の目的が新しい治療法開発の基礎的データ収集に有ることを患者に説明し、同意を得た上で検体を採取する。また、検査結果は患者のプライバシーが侵されないよう厳重に管理

することを義務とする。検体の送付時には、匿名非連結の原則を厳守した。

C. 研究結果

2G9 抗体の効果に関する研究

患者プロフィール：患者は全て HAART 施行中で、血中ウイルス量は検出感度以下と良好にコントロールされていた。末梢血 CD4 陽性細胞 10^6 個当たりの細胞内 HIV-1 DNA 量は 9~544 コピーと低値に分布していた。

2G9 抗体処理による細胞の形態変化：健常人の場合、2G9 抗体添加後 3 日目でも細胞の形態に変化は無く球状を保っていた。一方、患者リンパ球の場合、細胞精製時に既に歪な形態が散見されていたが、抗体添加により歪な形態をしたリンパ球数が増加した。

2G9 抗体処理による細胞内 HIV-1 DNA 量の変化：患者#1 では死細胞と生細胞を分離せず全細胞を回収した。全細胞中の HIV-1 DNA はコントロールと同様の値、13 コピー/ウェルを示し、生細胞画分か死細胞画分のどちらに HIV-1 DNA が分布しているかは不明だが細胞播種時と等量の HIV-1 DNA が回収できることを示している。患者#2~#7 に関しては死細胞と生細胞の分離を試みそれぞれの画分の HIV-1 DNA を定量した。評価不能な患者#2 と#3 を除き、何れのケースでも生細胞画分に回収された DNA 量はコントロールに比べ 5~30%の値を示した。

9F11 抗原の発現に関する免疫組織化学的研究

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。陰性コントロールとした MOLT4 は全く染まらなかった。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。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。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。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。

9F11 陽性率と CD4 陽性 T リンパ球数及び血中ウイルス量との相関性について：CD4 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。一方、血中ウイルス量と 9F11 抗原陽性細胞率には相関はみられなかった。

9F11 抗原の発現に関する FCM 研究

最初に、9F11 抗体に対する二次抗体である FITC 標識ストレプトアビジンの末梢リンパ球に対する非特異的反応は約 1%であることを確認した。次に、HIV-1 感染患者 4 例と健常人 1 例の T リンパ球について 9F11 抗原の発現を解析した。#1 症例では CD4 陽性 T リンパ球の 19%、CD8 陽性 T リンパ球の 26.5%が 9F11 陽性であった。4 例の患者検体の結果をまとめると、CD4 陽性 T リンパ球のうち 9F11 陽性を示す細胞は 10.1~44.5 (平均 28.9) %、健

常人は 5.5%であった。CD8 陽性 T リンパ球では患者で 11.9~66.9 (34.6) %、健常人は 13.0%であった。どちらの場合も患者検体は健常人検体と比較して有意に 9F11 抗原陽性率が高かった。

D. 考察

HIV 感染症/エイズの克服は引き続き人類にとって最重要課題の一つである。先進諸国では抗 HIV 薬を用いた多剤併用療法 HAART によりエイズ死亡率を大幅に減少させることに成功するなど大きな進歩を見ているが、発展途上国では経済的理由からその進展は遅々としている。しかも、HAART は感染細胞を直接排除する作用を有していないので、“HAART は一生継続”という重い課題がのしかかっている。この問題を解決しうる HIV 感染症治療はワクチンに頼るしかないというのがコンセンサスだと思われる。本研究班で研究対象とした単クローン性抗体は、この観点から見てその臨床応用の可能性を探るべき重要な抗体だと思われる。9F11 は HIV 感染により CD4 陽性リンパ球にその発現が増強される抗原であることは明白になったが、少量ではあるが健常人 CD4 リンパ球にも発現しており、かつ CD8 陽性細胞にも発現が認められた。したがって、抗 9F11 抗体の臨床応用には慎重な工夫が必要と思われた。一方、抗 2G9 抗体には HIV-1 感染細胞に対する殺細胞活性を確認できたので今後は感染細胞および正常リンパ球での発現につき検討を加えることが大切であると考えている。最後に、技術的な点に触れるが、研究開始時で確立できた高感度リアルタイム PCR 法は今

後もこのラインの研究で威力を発揮すると思われる。

E. 共同研究者

(国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター) 永井裕美、萩原智子、服部純子、和田かおる、内海 眞、濱口元洋、間宮均人(同・内科) 山中克郎、(同・検査科) 多和田行男

F. 研究発表

[論文発表]

1. Selection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants with an Insertion Mutation in the P6^{gag} and P6^{pol} Genes under Highly Active Antiretroviral Therapy.
Shirou Ibe, Naomi Shibata, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda
Microbiol. Immunol., 47, 71-79 (2003).
2. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Lopinavir, Ritonavir and Efavirenz.
Yoshiko Usami, Tsuyoshi Oki, Masahiko Nakai, Masafumi Sagisaka and Tsuguhiro Kaneda.
Chem. Pharm. Bull. 51, 715-718 (2003).
3. 抗 HIV 療法のモニタリング(第 16 回日本エイズ学会シンポジウム記録)
金田次弘、加藤真吾、山元泰之、千葉智子、杉浦 互
日本エイズ学会誌 5, 109-112

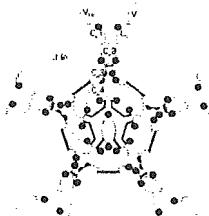
- (2003).
4. Prevalence of Drug-resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Therapy-naïve Patient and Usefulness of Genotype Testing.
Shirou Ibe, Naoe Hotta, Uta Takeo, Yukio Tawada, Naoto Mamiya, Katsuo Yamanaka, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda
Microbiol. Immunol **47**, 499-505 (2003).
 5. Prevalence of infection and genotypes of GBV-C/HGV among homosexual men.
Junko Hattori, Shiro Ibe, Hiromi Nagai, Kaoru Wada, Takayuki Morishita, Katsuhiko Sato, Makoto Utsumi and Tsuguhiro Kaneda
Microbiology & Immunology **47**, 759-763 (2003)
 6. Pharmacokinetics of Lopinavir after Administration of Kaletra in Healthy Japanese Volunteers.
T. Oki, Y. Usami, M. Nakai, M. Sagisaka, H. Ito, K. Nagaoka, K. Yamanaka, N. Mamiya, M. Utsumi and T. Kaneda.
Biol. Pharm. Bull. **27**, 261-265 (2004)
 7. HIV 治療遂行のためのモニタリングシステムの進展
金田次弘、白阪琢磨
医療, **58**, 83-84 (2004).
 8. 薬剤耐性検査-gag 遺伝子内に検出された挿入変異の意義
伊部史朗、内海 眞、金田次弘
医療, **58**, 88-90 (2004).
 9. HIV-1 薬剤耐性検査の感度改善
浅黄 司、伊部史朗、金田次弘、鈴木博義、手塚文明、西村秀一、佐藤 功、山崎孝文
医療, **58**, 91-93 (2004).
 10. HIV-1 DNA 量のマーカーとしての意義 - PNA-ISH 法との比較
和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海眞、金田次弘
医療, **58**, 96-98 (2004).
 11. ロピナビル/リトナビルおよびエファビレンツの血中濃度同時測定法の確立
宇佐美好子、大木剛、中井正彦、鷺坂昌史、金田次弘
医療, **58**, 102-104 (2004).
 12. ロピナビルの血中濃度測定 : エファビレンツとの同時測定法の確立, 健常人における体内動態及び臨床応用への展望
宇佐美好子、間宮均人、大木 剛、中井正彦、金田次弘
新薬と臨床, **53**, 449-457 (2004).
 13. Delayed HIV-1 Infection of CD4⁺ T Lymphocytes from Therapy-naïve Patients Demonstrated by Quantification of HIV-1 DNA Copy Numbers
K. Wada, H. Nagai, T. Hagiwara, S. Ibe, M. Utsumi and T. Kaneda
Microbiology & Immunology **48**, 767-772 (2004).
 14. 未治療 HIV-1 感染者における薬剤耐性ウイルスの検出頻度とその特徴
伊部史朗、金田次弘

- 現代医療、**36**, 65-72 (2004).
15. New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application.
H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda
J. Virol. Methods **124**, 157-165 (2005).
 16. HPLCによるプロテアーゼ阻害剤アタザナビル血中濃度測定法の開発。
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
日本病院薬剤師会雑誌、**41**, 731-734 (2005).
 17. カレトラ™投与外来 HIV 感染患者における脂質異常とロピナビル血中濃度の評価。
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
日本病院薬剤師会雑誌、**41**, 873-876 (2005).
 18. Conventional HPLC Method Used for Simultaneous Determination of the Seven HIV Protease Inhibitors and Nonnucleoside Reverse Transcription Inhibitor Efavirenz in Human Plasma.
M. Takahashi, M. Yoshida, T. Oki, N. Okumura, T. Suzuki and T. Kaneda
Biol. Pharm. Bull., **28**, 1286-1290 (2005).
 19. PNA-In Situ Hybridization Method for Detection of HIV-1 DNA in Virus-Infected Cells and Subsequent Detection of Cellular and Viral Proteins.
T. Hagiwara, J. Hattori and T. Kaneda.
In Situ Hybridization Protocols 3rd edition (edited by I. A. Darby), Humana Press, NJ, pp139-149 (2005).
- [学会発表]
1. 未治療 HIV-1 感染患者における CD4 陽性細胞数と細胞内 HIV-1 DNA 量の相関性。
和田かおる、永井裕美、萩原智子、内海 眞、金田次弘
第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)。
 2. 高感度リアルタイム PCR 法のバリデーション。
永井裕美、和田かおる、森下高行、内海 眞、西山幸廣、金田次弘
第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)。
 3. 男性同性愛者における HIV-1 と GBV-C ジェノタイプの解析。
服部純子、伊部史朗、永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘
第 17 回日本エイズ学会総会 (平成 15 年 11 月-2003)。
 4. ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の HIV 増殖抑制作用機序に関する研究。
山本直彦、伊部史朗、和田かおる、金田次弘、内海 眞、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、森 治代、川畑拓也
第 17 回日本エイズ学会総会 (平成

- 15年11月-2003)。
5. 血漿HIV-1 RNA及び末梢血HIV-1 DNAで検出される薬剤耐性変異の比較。
堀田直恵、伊部史朗、金田次弘
第17回日本エイズ学会総会(平成15年11月-2003)。
 6. 未治療HIV-1感染症患者における薬剤耐性ウイルス出現頻度の推移。
伊部史朗、堀田直恵、内海 眞、金田次弘
第17回日本エイズ学会総会シンポジウム(平成15年11月-2003)。
 7. Activity of HIV-1 provirus in CD4-positive T lymphocytes from patients responding well to HAART.
T. Kaneda, H. Nagai, K. Wada, U. Takeo, J. Hattori, T. Hagiwara, S. Ibe, Y. Tawada, M. Utsumi and T. Morishita
1st International Workshop on HIV Persistence during Therapy
Saint Martin, FWI, December 10-12, 2003.
 8. 未治療患者に対するHIV-1遺伝子型薬剤耐性検査の意義
伊部史朗、多和田行男、間宮均人、山中克郎、濱口元洋、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-2004)。
 9. 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、西山幸廣、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-2004)。
 10. 未治療患者の薬剤耐性HIV-1: 検出頻度、特徴、宿主タンパク質との相互作用
金田次弘
第2回「小型シンクロトン光源とその医療・産業応用に関する研究会」(平成16年7月-2004)。
 11. HIV-1 mRNA levels in peripheral CD4+T lymphocytes from patients responding well to HAART.
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-2004)。
 12. HIV-1感染患者におけるG型肝炎ウイルス(GBV-C)重複感染の影響
服部純子、内山雅宇、加藤 稔、濱口元洋、西山幸廣、金田次弘
第18回日本エイズ学会総会(平成16年12月-2004)。
 13. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害剤耐性HIV-1の増殖能解析
伊部史朗、澤木 香、森下高行、佐藤克彦、金田次弘
第18回日本エイズ学会総会(平成16年12月-2004)。
 14. 未治療患者に検出された薬剤耐性HIV-1のgag遺伝子領域内アミノ酸変異の解析
澤木 香、伊部史朗、金田次弘
第18回日本エイズ学会総会(平成16年12月-2004)。
 15. ケニアにおける未治療HIV感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの流行状況について
山本直彦、森下高行、佐藤克彦、金田次弘、伊部史朗、永井洋美、

- 内海 眞、宮城島拓人
第 18 回日本エイズ学会総会（平成 16 年 12 月－2004）。
16. プロテアーゼ阻害剤アタザナビルの HPLC による血中濃度測定法の開発
高橋昌明、吉田昌生、大木 剛、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会（平成 16 年 12 月－2004）。
17. 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、西山幸廣、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会（平成 16 年 12 月－2004）。
18. MSG (major surface glycoprotein) を用いた Real-time PCR 法による Pneumo-cystis jirovecii 迅速定量法の確立
小柏 均、永井裕美、水野善文、堀 洋美、加藤 稔、多和田行男、玉村和栄、間宮均人、濱口元洋、金田次弘
第 18 回日本エイズ学会総会（平成 16 年 12 月－2004）。
19. 未治療患者に検出された薬剤耐性 HIV-1 のウイルス学的特徴
伊部史朗、澤木 香、金田次弘
第 15 回抗ウイルス化学療法研究会（屋久島）（平成 17 年 5 月－2005）。
20. HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査法に関するアンケート調査
浅黄 司、金田次弘、伊部史朗、松田昌和、吉田 繁、津畑千佳子、大家正泰、近藤真規子、貞升健志、瀧永博之、正兼亜季、佐藤克彦、秦 眞美、溝上康司、森 治代、南 留美、渡邊香奈子、岡田清美、杉浦 互
第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年 12 月－2005）。
21. 未治療患者由来プロテアーゼ阻害薬剤耐性 HIV-1 の増殖能解析
伊部史朗、藤崎誠一郎、藤崎彩恵子、金田次弘
第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年 12 月－2005）。
22. 新規 HIV-1 感染者における薬剤耐性の頻度に関する全国疫学調査－2003 年から 2004 年にかけての報告
杉浦 互、瀧永博之、吉田 繁、千葉仁志、浅黄 司、松田昌和、岡 慎一、近藤真規子、今井光信、貞升健志、長島真美、伊部史朗、金田次弘、濱口元洋、上田幹夫、正兼亜季、大家正義、渡邊香奈子、白坂琢磨、山本善彦、森 治代、小島洋子、中桐逸博、高田 昇、木村昭郎、南 留美、山本政弘、健山正男、藤田次郎
第 19 回日本エイズ学会総会（平成 17 年 12 月－2005）。
23. プロテアーゼ阻害薬 7 剤とエファビレンツの同時血中濃度測定法の開発及びその臨床応用
高橋昌明、伊部史朗、久高祐一、奥村直哉、鈴木達男、金田次弘
第 19 回日本エイズ学会総会（平成

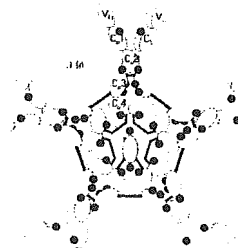
- 17年12月-2005)。
24. B、CRF01_AEを含む複数のサブタイプの HIV-1 定量法の確立
水野善文、永井裕美、加堂真由、
渡辺朝子、森下高行、山本直彦、
伊部史朗、重見 麗、藤崎誠一郎、
稲田頼太郎、金田次弘
第 19 回日本エイズ学会総会 (平成
17年12月-2005)。
25. HAART 著効例 HIV-1 感染患者における
残存 HIV-1 プロウイルス複製レベル
の評価
永井裕美、水野善文、加堂真由、
服部純子、濱口元洋、間宮均人、
西山幸廣、金田次弘
- 第 19 回日本エイズ学会総会 (平成
17年12月-2005)。
26. Persistence of protease
inhibitor-resistant HIV-1 in
therapy-naïve patients
T. Kaneda, S. Ibe, K. Sawaki, T.
Morishita, U. Shigemi, N. Mamiya
and M. Hamaguchi
2nd International Workshop on HIV
Persistence during Therapy
Saint Martin, FWI, December 6-9,
2005



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

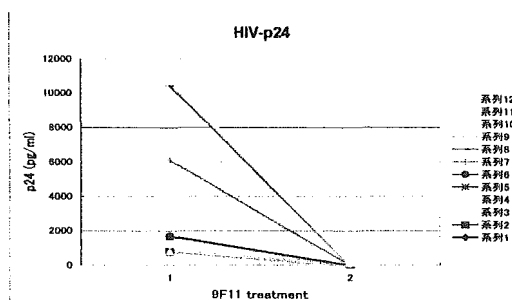


- ・ HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、TCマウスおよびKMマウス(キリンビール社)を用いて樹立した。
- ・ 9F11抗体はHIV感染細胞に反応して補体依存性の細胞死およびHIVウイルス溶解を引き起こす。
- ・ 2G9抗体はHIV感染細胞および潜伏感染細胞にも反応してアポトーシス誘導による細胞死を引き起こす。
- ・ CF8、3B4B抗体はNefに対するIgM抗体であり、HIV感染細胞に特異的に反応する。
- ・ 9F11および2G9の反応する抗原分子を同定し、HIV感染症におけるこれらの抗原発現の意義を明確にする。
- ・ Nefの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

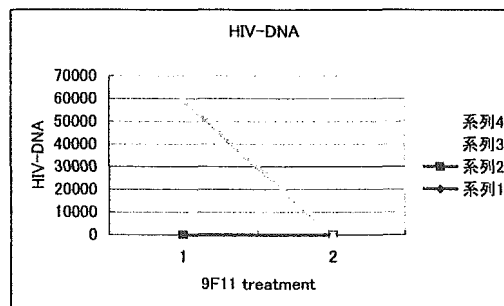
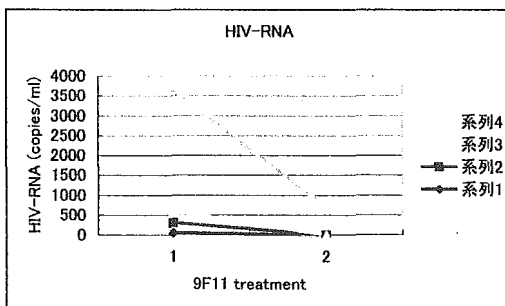
CD4陽性細胞に10ug/ml 9F11を10%FHS存在下に1晩反応後、wash outしてから、抗CD3抗体及びIL2存在下に培養し、10日後のp24およびHIV-RNA、20日後のHIV-DNA数を解析した。



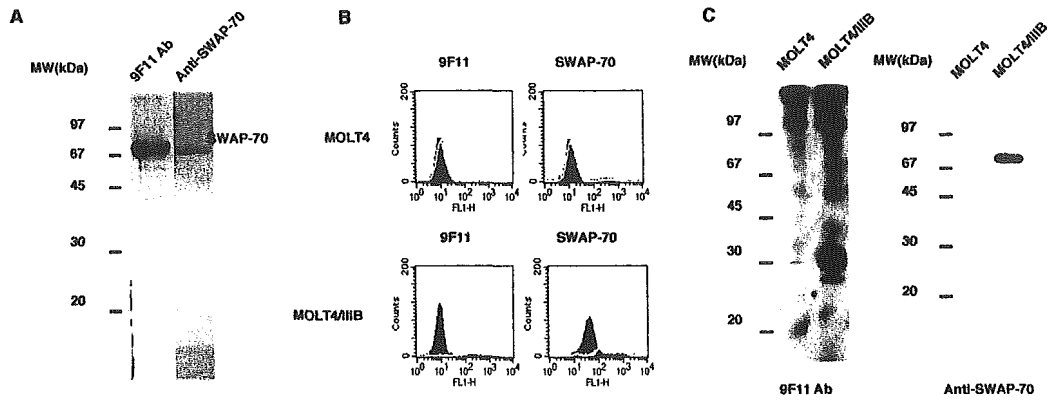
HIV-P24:
9F11処理により全例で高い抗HIV効果が認められた。p24検出可能患者12例中8例で検出限界以下になった。

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なかった。



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

