

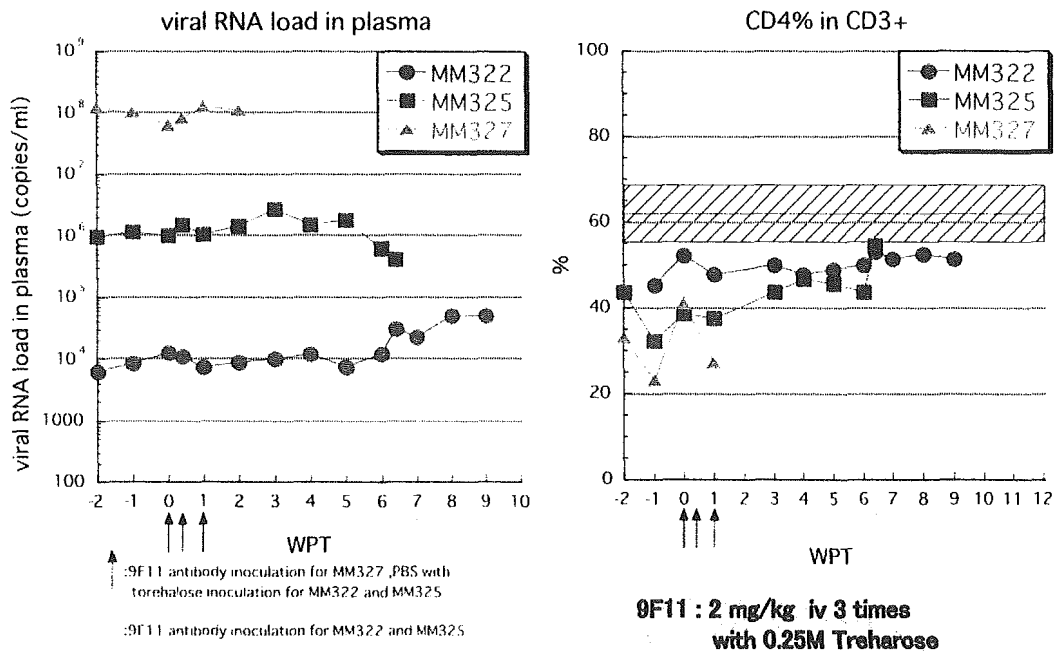
9F11抗体の解析



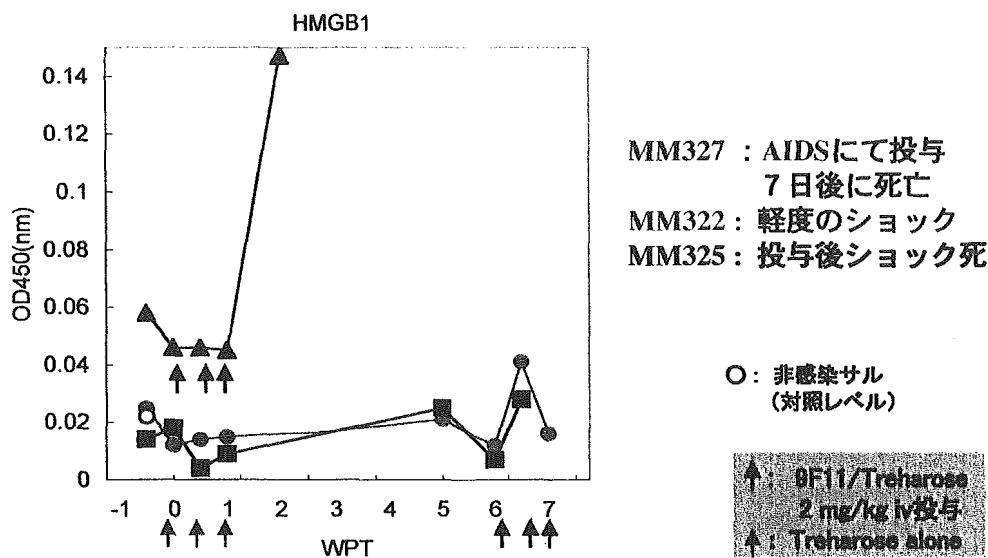
- 9F11はHIV感染細胞に反応して1ug/ml以下で補体依存性の細胞死およびウィルス溶解を誘導して、抗HIV活性を示すヒトIgMモノクローナル抗体である。
- 9F11抗原としては、HIV感染により発現誘導されて細胞膜上に現れるSWAP-70が同定された。また、さらにWestern解析で30kDの分子が認識されており、SWAP-70分子との異同を解析中である。
- 9F11はHIV感染者末梢血CD4細胞に反応する。血中のCD4細胞数の低下に伴いその反応性は上昇傾向を示し、9F11抗原発現はHIV感染病態を反映すると考えられる。
- HIV感染者末梢血CD4細胞を用いた、ex vivoでの抗HIV効果の検討を行った。
その結果、ウィ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%以上の高い抗ウィ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ATL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

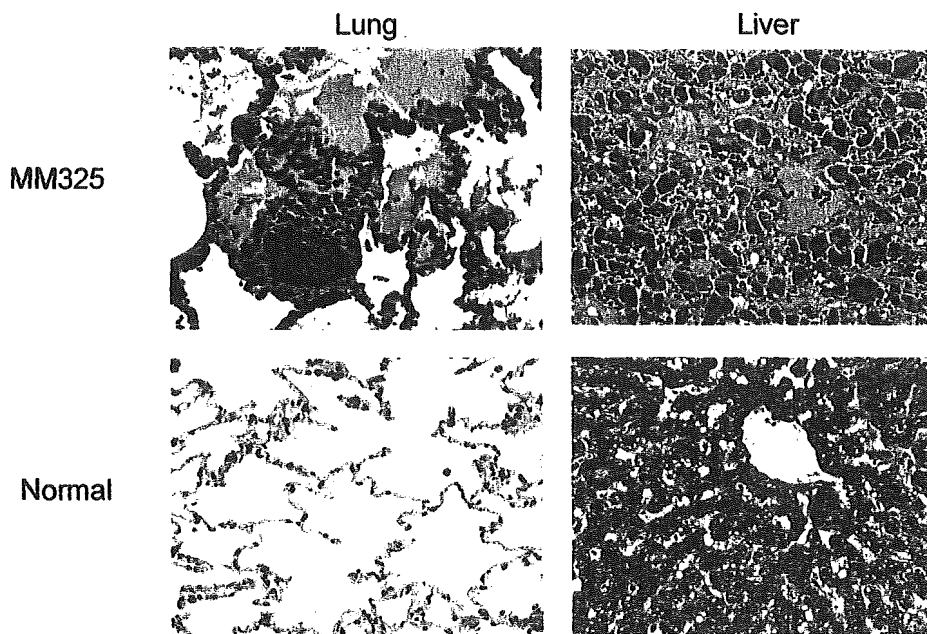


HMGB1 level in plasma during 9F11-IgM administration in SIV-infected Monkey



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)



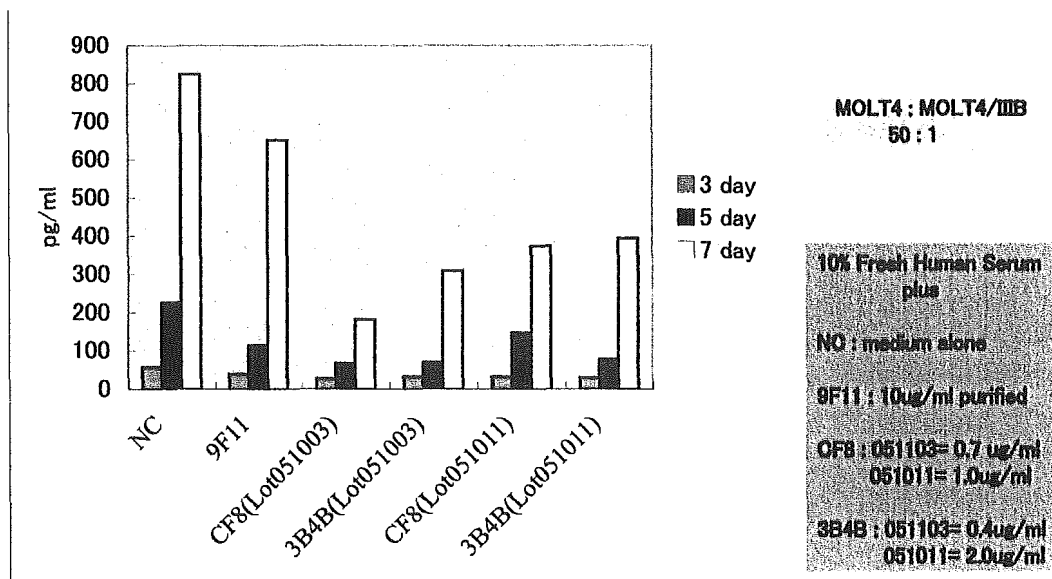
急性アナフィラキシーショック特有の強度の鬱血、浮腫が肺および肝臓で観察される。

抗Nef-IgM抗体の特HIV活性の検討

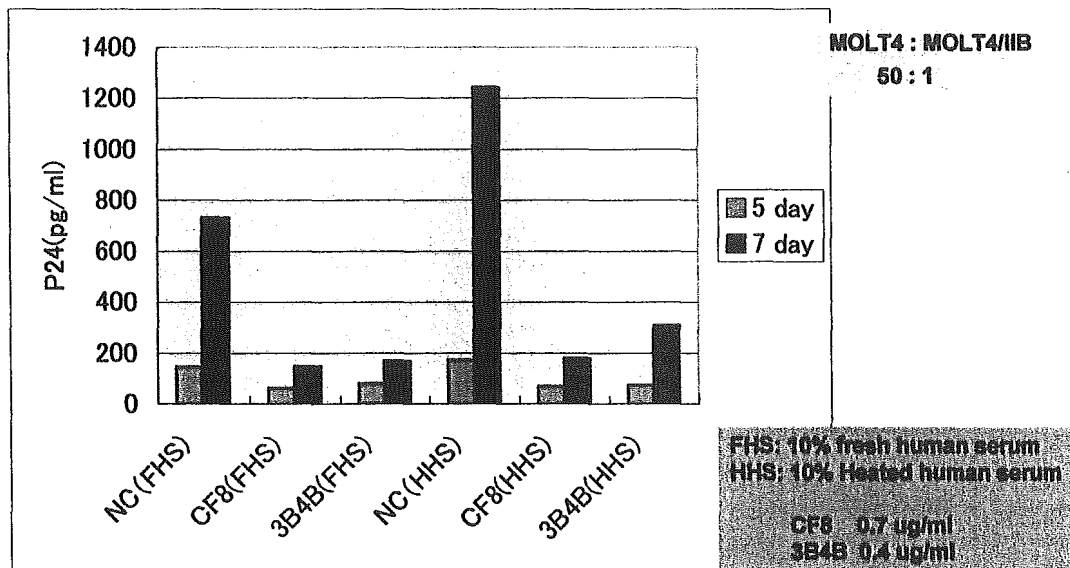


- リコンビナントNefをTCマウスおよびKMマウスに免疫した後、MOLT4/IIIIB細胞に反応するIgMクローンを選別して、3B4Bおよび2C8クローンを樹立した。
- ELISA法およびWestern Blot法にて、3B4Bおよび2C8が抗Nef抗体であることを確認した。
- これらのハイブリドーマを無血清培養に導入した。抗体産生効率を上げるために、抗体産生増強が知られるIL4,IL5などのサイトカインや接着分子などの添加培養を試みた。
- 無血清培養上清よりの精製抗体作成を試みた。
- 慢性感染細胞および潜伏感染細胞OM10.1, U1, ACH2などの反応性を検討した。
- 無血清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

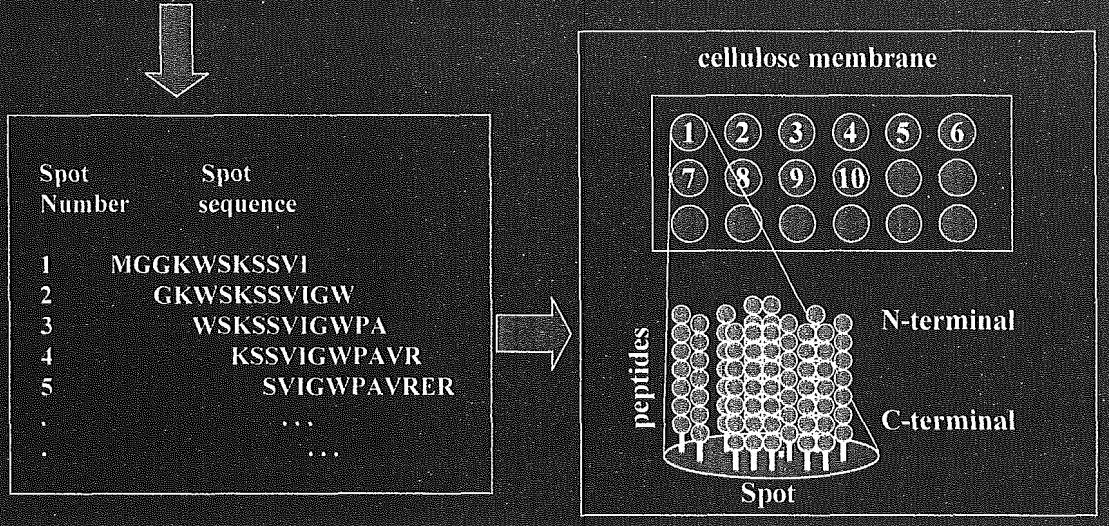
抗Nef-IgMモノクローナル抗体

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
 TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEK
 GGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW
 CYKLPVPEPKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPPEREVLEWRFDSR
 LAFHHVARELHPEYFKNC

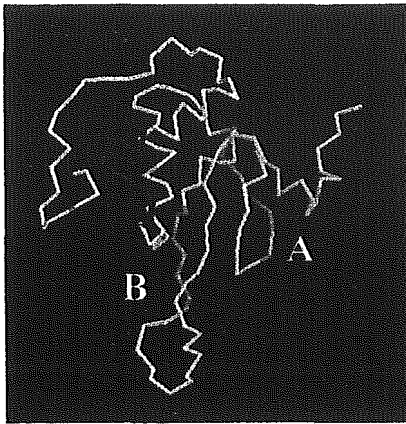


HIV-1感染細胞に反応する抗Nef-IgM抗体のエピトープ解析(ペプチドアレイ法)

	1	<u>MGGKWSKSSVIGWPAVRERMRRRAE</u> PAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAA	50	
E9		RERMRRAE		
3B4B				Dr A Iwamoto's
CF8				
		Nef3B57J		Nef3B90I
	51	<u>NNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGL</u>	100	
E9		WLEAQEEEEV		
3B4B				
CF8				
		Nef3B111T		
	101	<u>IHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW</u> CYKLPVPEP	150	
E9		TQGYFPDW		
3B4B		WYHTQ DWQNYT		
CF8		DWQNYTPG		
		Nef3B177J		
	151	<u>DKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPPEREVLEWR</u> FDSRLAFHHVARELHP	200	
E9		EVLEWR		
3B4B		LHPVSL		Dr Y Fujii's
CF8				
	201	EYFKNC	206	
E9				
3B4B				
CF8				

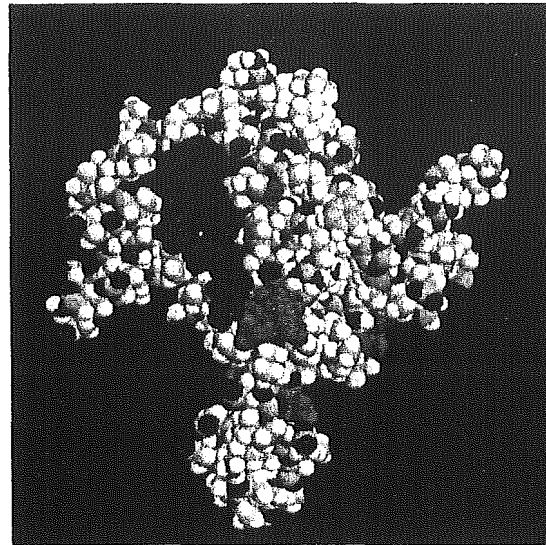
Blue under lined:高変異部位を示す

CF8: 抗Nef-IgM抗体反応エピート部位 (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。

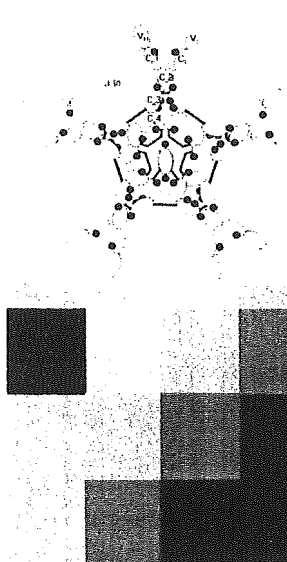
SIV感染細胞での反応性も確認されたので、抗体投与によるin vivo実験を行った。

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誘発が観察された。⇒ ⇒ ⇒ 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。

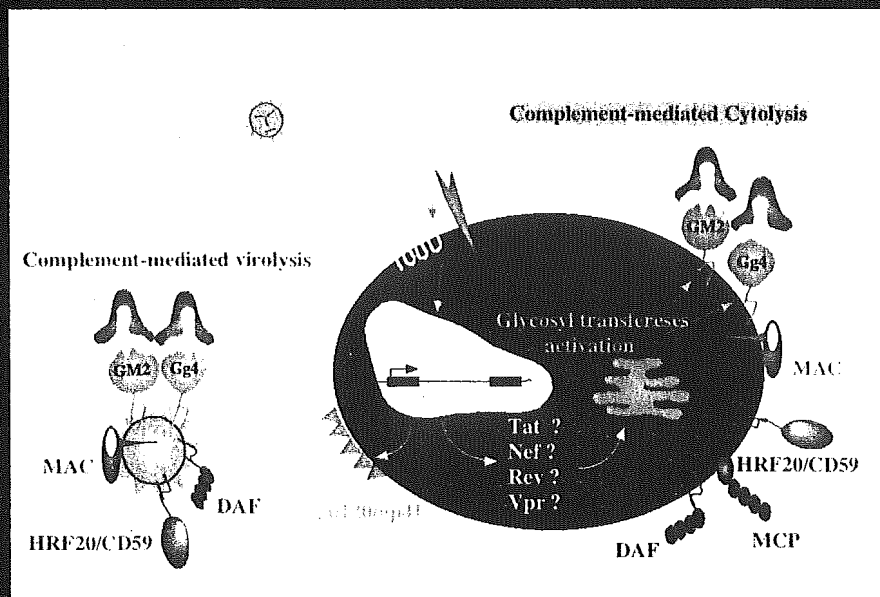


研究課題： HIV感染症の治療開発に関する研究

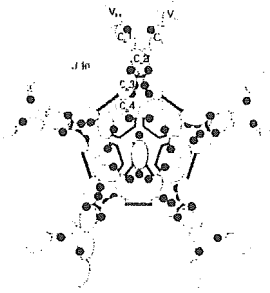
名古屋市立大学大学院医学研究科 岡田則子
国立名古屋病院臨床研究センター 金田次弘
福祉村病院長寿医学研究所 岡田秀親

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。



研究目的



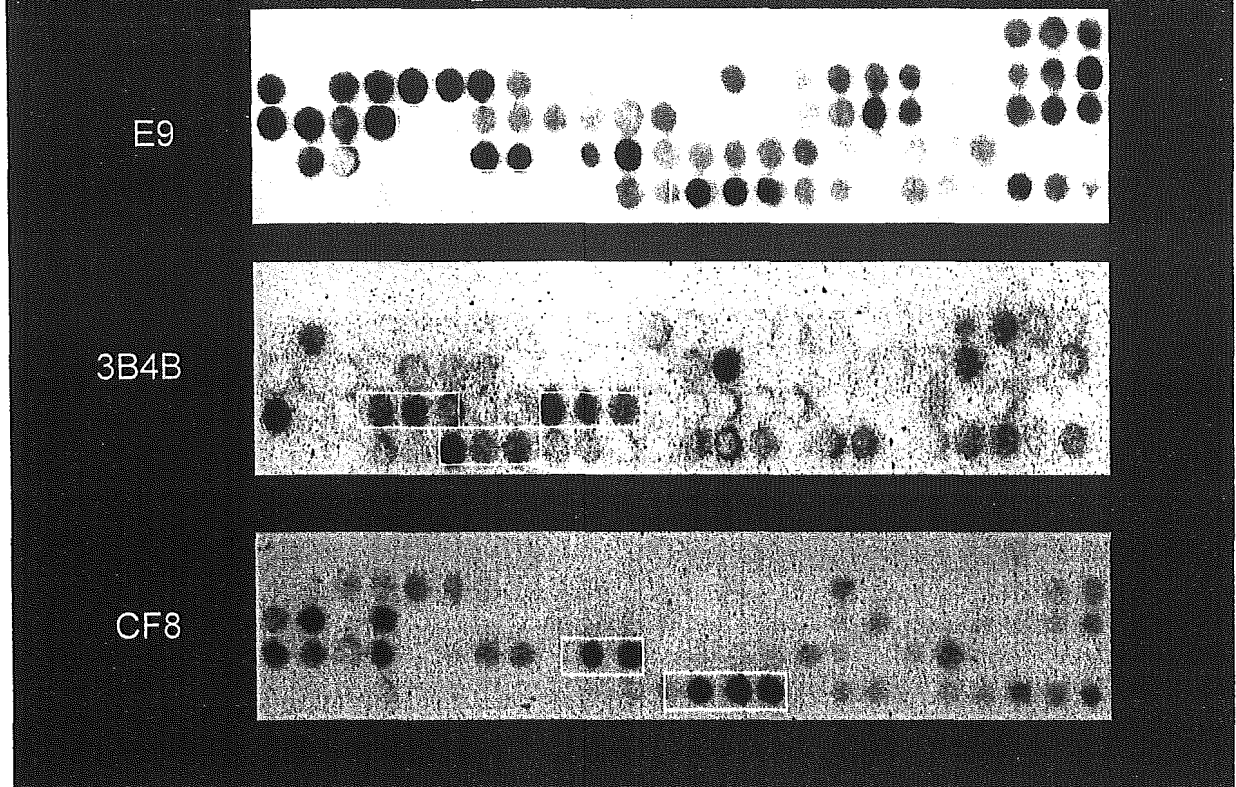
IgM抗体 初期感染防御抗体

- 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。

Reactivity of anti-Nef IgM mAbs to Peptide of IIIB-Nef



HIV感染細胞に反応する抗Nef-IgM抗体の解析

E9 マウスIgM
3B4B ヒトH鎖、マウスL鎖のキメラIgM
CF8 ヒトIgM

ペプチドアレイを作製して3種のIgM抗体の反応エピトープ解析を行った。

その結果、エピトープ部位が3カ所同定された。

これらのエピトープペプチドを作製して、感染細胞上での膜発現エピトープ部位を同定する。

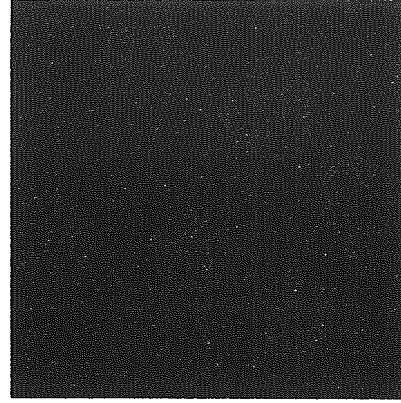
有効なエピトープを用いて、高反応性の抗Nefヒト抗体を作製する。

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する。

持続感染細胞MOLT4-III B細胞における9F11抗原の発現

MOLT4-III B

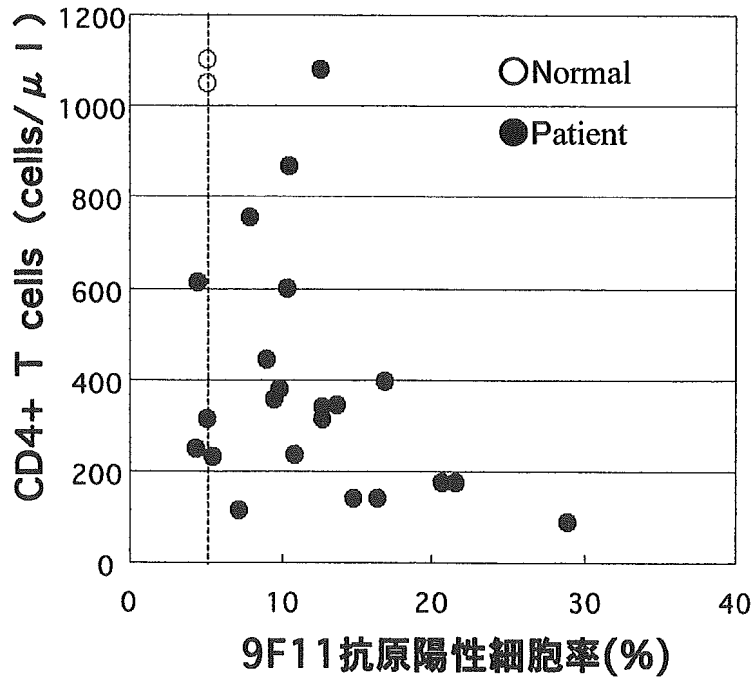
MOLT4



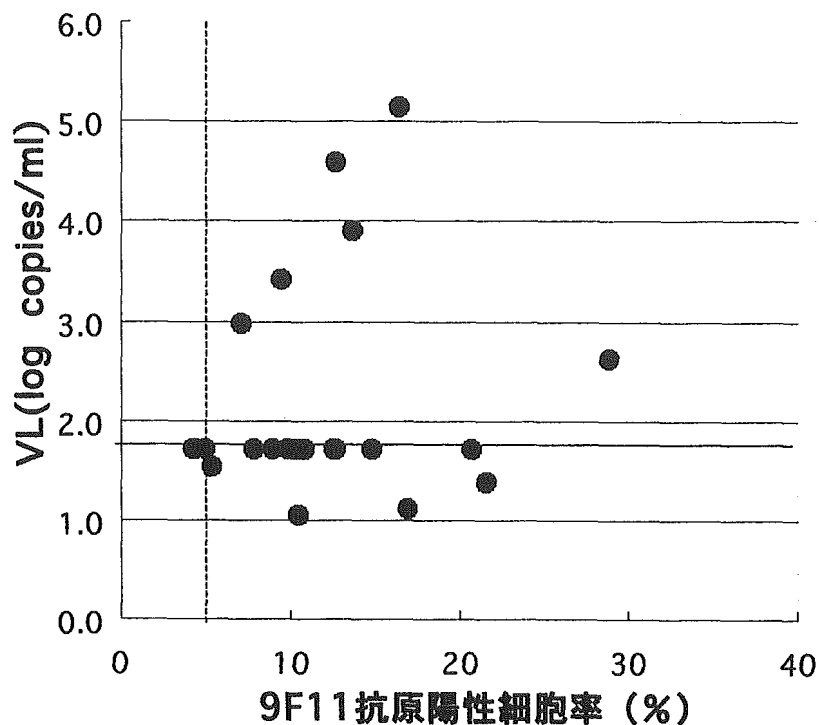
100%(+)

100%(-)

9F11抗原陽性細胞率とCD4陽性Tリンパ球数

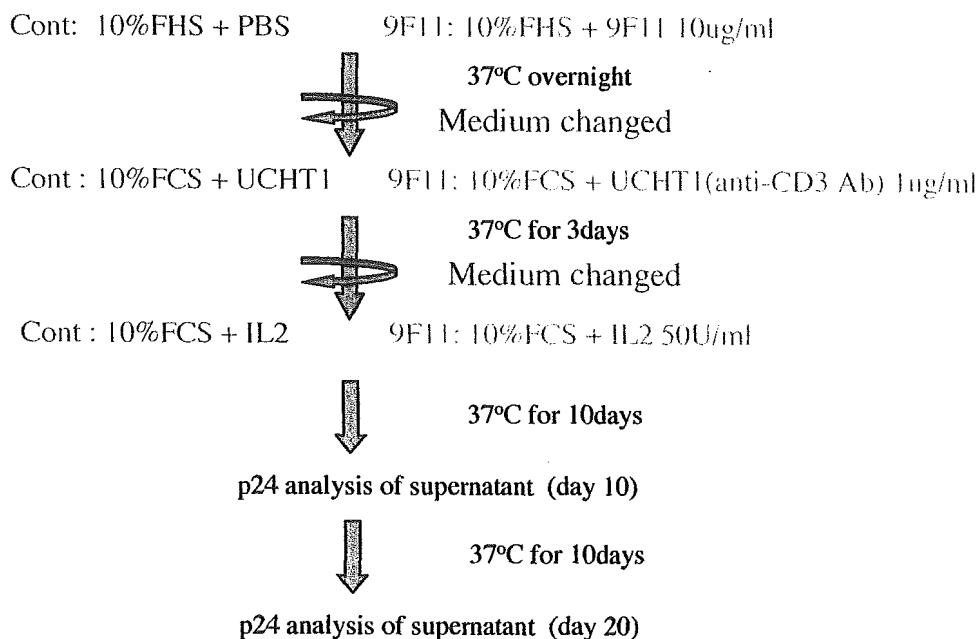


9F11抗原陽性細胞率と血中ウイルス量

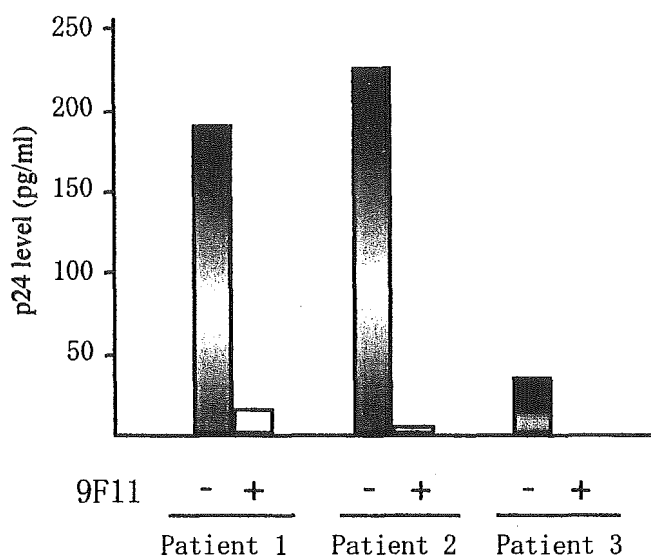


Experimental Protocol for detection of anti-HIV effect of 9F11 ex vivo

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



9F11 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 9F11for 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。

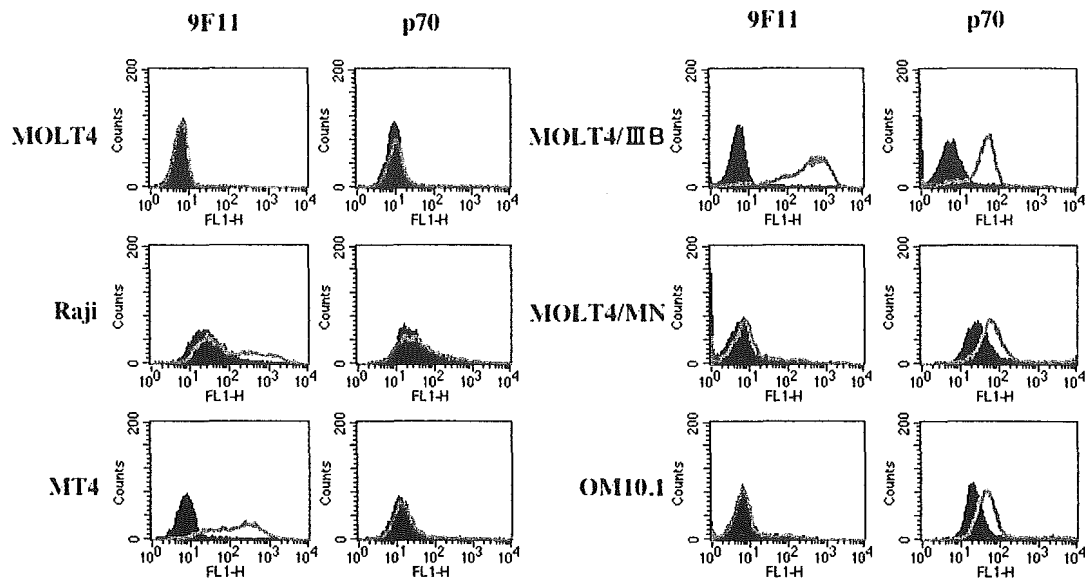
Patient No	Cultivation day	P24 (pg/ml)		%inhibition
		10%FHS alone	10%FHS +9F11	
1	10	2582.5	0	100
2	10	445.9	0	100
3	20	38.4	0	100
4*	20	5.1	0	100
5	10	4301.2	3.5	99.92
6	10	750.8	22.3	97.02

* 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。

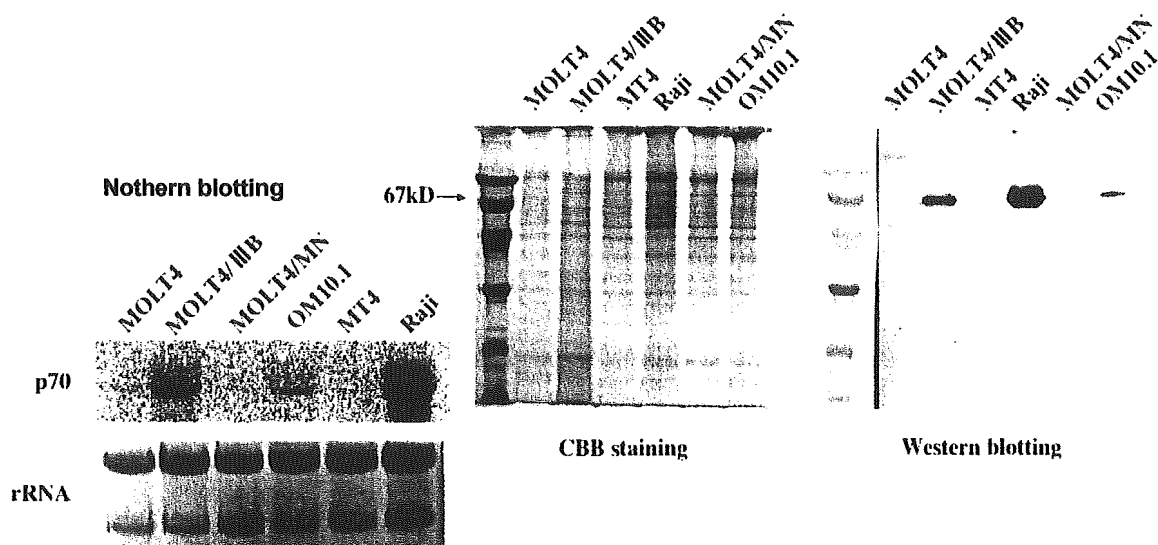
9F11抗原の同定

- 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。

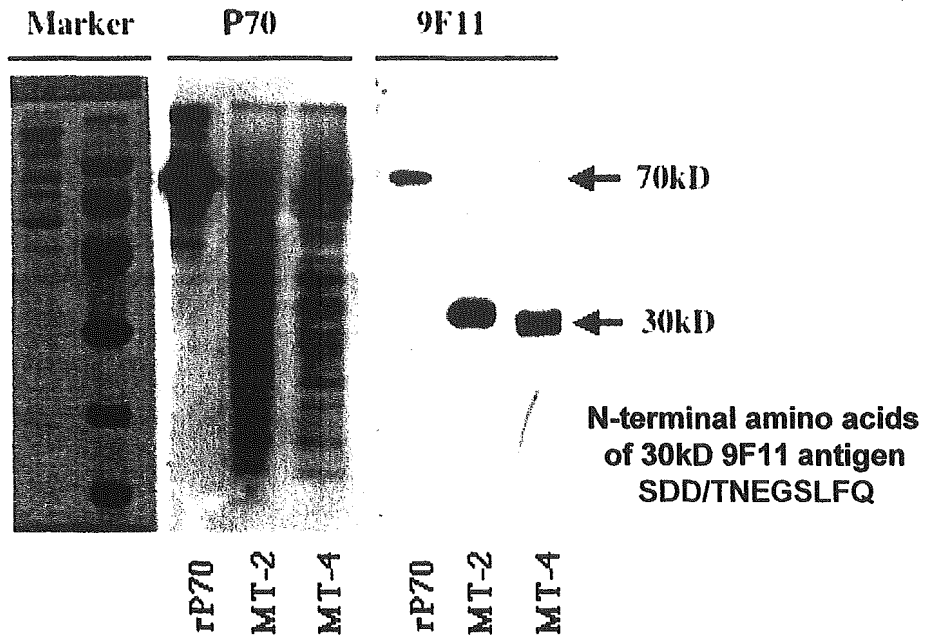
Polyclonal anti-P70 Ab reacted with HIV-infected cells



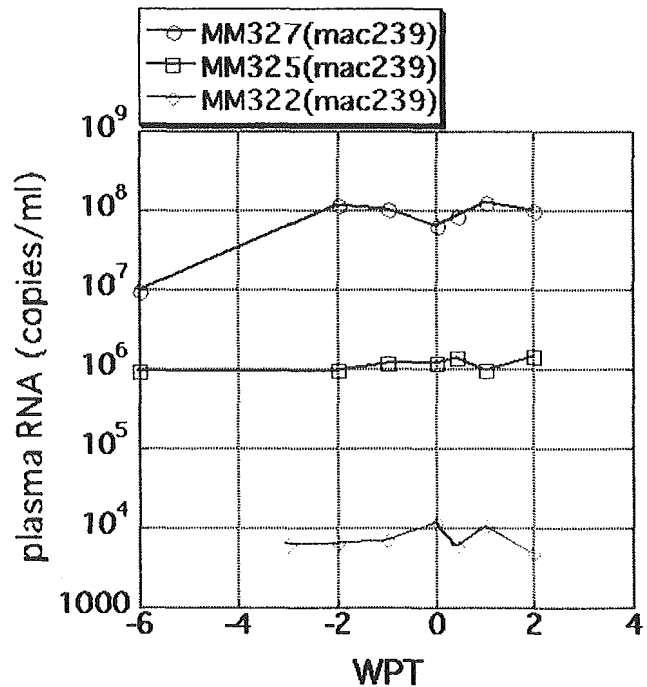
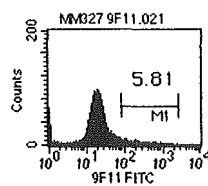
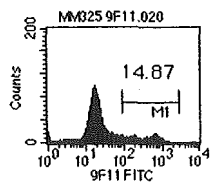
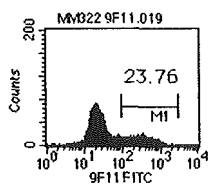
Expression of P70 in HIV-infected cells Northern and Western blot analysis



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1ug/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。

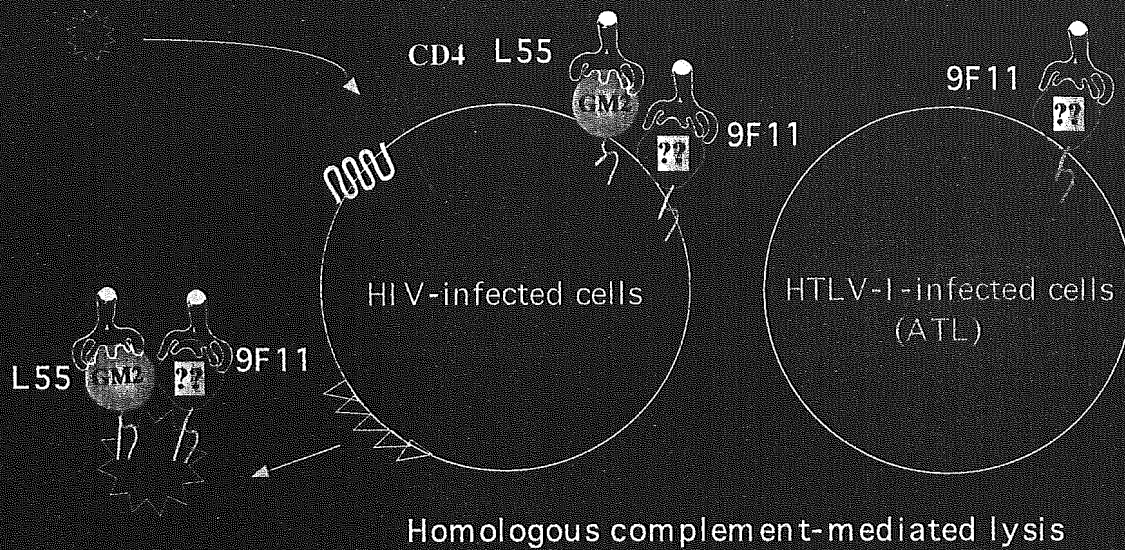
9F11はサルSIV感染細胞にも反応性を示すので、9F11の抗HIV効果とその安全性をSIV/SHIV感染サルを用いて検討することが可能である。

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。

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	?	Infected cells	?

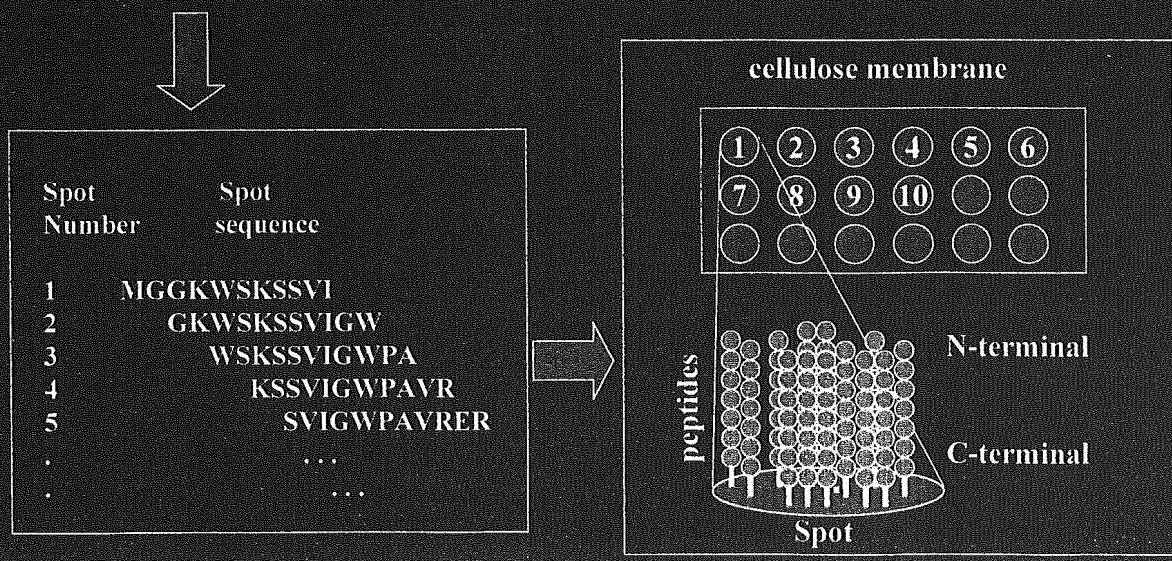
Human IgM monoclonal antibodies effective to HIV-1 infected cells and HTLV-I-infected cells



IgM-9F11

Peptide array (11mer) of HIV-IIIB Nef

MGGKWSKSSVIGWPAVRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSS
 NTAANNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLK
 EKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTF
 GWCYKLPVPEPKVEEANKGENTSLHPVSLHGMDDPEREVLEWRF
 DSRLAFHHVARELHPEYFKNC



Epitope Analysis of anti Nef IgM mAbs to HIV-IIIB Nef

1 MGGKWSKSSVIGWPAVRERMIRRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAISSNTAA 50
E9 RERMIRRAE
3B4B
CF8

Nef3B57J Nef3B90I
51 NNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHELKEKGGLEGL 100
E9 WLEAQEEEEVGFV
3B4B
CF8

Nef3B111T
101 IHSQRRQDILDLWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEP 150
E9 TQGYFPDW
3B4B WYHTQ DWQNYT
CF8 DWQNYTPG

Nef3B177J
151 DKVLEEANKGENTSLHPVSLHGMDDPEREVLFWREDSRLAFIHIVARELHP 200
E9 EVLEWR
3B4B LHPVSL
CF8 EVLEWR

201 EYFKNC 206

E9
3B4B
CF8

抗HIV効果を期待される ヒトIgMモノクローナル抗体

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,IgA1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
)。