



IgM抗体とHIV感染防御

名古屋市立大学大学院 医学研究科生体防御学

岡田 則子

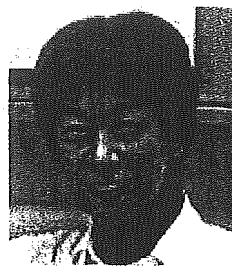
感染・炎症・免疫 第33巻 第4号 別刷

平成15年12月25日発行

東京 医薬の門社



IgM抗体とHIV感染防御



おかだ・のりこ

1970年公立薬科大学卒業。三共(株)中央研究所、北里研究所、東京大学医科学研究所研究員を経て、1983年より福岡大学助手、助教授を務める。1995年名古屋市立大学医学部分子医学研究所助手、1998年より現所属、助教授。

岡田 則子*

Summary

IgM抗体は自然抗体として古くよりその存在が知られている。抗体活性の検索には試験管内で希釈してその活性を検討解析することより、多くの場合、自然抗体は反応のバックグラウンドとして無視されてきた。これは、補体系における抗体依存性の活性化経路である古典的経路が先に重要視されていたと同様の経過であろう。実際には補体系において副経路がより重要な生体防御機構であることが後に判明したように、ノックアウトマウスの解析なども相まって、自然抗体IgMの感染防御における重要性がその分子機構と共に解き明かされ始めている。我々はHIV感染症における、IgM抗体の感染防御への関与と、その治療への応用の可能性を検討しており、興味ある知見を得ているので併せて紹介する。

Key words : IgM, 自然抗体, HIV, 感染防御, モノクローナル抗体

はじめに

細菌やウイルスなどが生体に侵入感染するルートはさまざまであり、種々の感染防御機構が発動し、その対処に当たる。これらの感染の多くは、呼吸器、消化器や尿路などの粘膜を介して成立し、その初期防御を担うのは粘膜局所での分泌型IgAや顆粒球であり、その防御効果は局所リンパ節に波及する¹⁾。感染がさらに血流中に進行するような、例えば肺炎双球菌、溶血性インフルエンザ、ミーズルスウイルス、インフルエンザウイルスやHIVなどの感染においては自然抗体、補体そして初期T細胞依存性あるいは非依存性のIgM抗体が重要な役割を担っている^{2,3)}。

I. IgM自然抗体の感染防御活性

IgM自然抗体の多くは腹腔内CD5⁺B1細胞により産生されるが、抗原によってはその一部は脾臓内CD5⁻B2細胞によっても産生されることが認められている⁴⁾。実験的に抗原や細菌フリーのマウスとの比較においても自然抗体の量やパターンは変わらないので、内的および外的要素というよりも、固有に決定されていると考えられる^{5,6)}。さらに遺伝的背景が重要である。例えばVSV (vesicular stomatitis virus) に対する自然抗体価は近交系マウス間で8~32倍の系統による差異を生じており、これらの抗体は体細胞突然変異を殆ど受けておらず、germlineの可変領域によってコードされている。さらに、これらの多くがIgM抗体であり(IgAやIgGの報告もある)、その結合親和性は $5 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-11}$ と

自然抗体 (natural antibody)

B細胞を有する動物において検出される抗体で、能動免疫されて産生される抗体以外の抗体。主要なアイソタイプはIgMであるが、IgAやIgGも存在する。直接の防御因子であると共に、抗イデオタイプ抗体によるB細胞分化やサイトカイン産生などに対する調節機能なども推測される。

*名古屋市立大学大学院
医学研究科生体防御学
〒467-8601
名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1
E-mail
drnoriko@med.nagoya-cu.ac.jp

表1 自然抗体 (IgM) の感染防御機構

- (A) 病原体に結合して中和
- (B) 補体系の活性化
 - 補体依存性の細胞溶解
 - 脾臓内のmarginal zoneに抗原を集積 → T細胞非依存性の抗体産生
 - B細胞の活性化 → T細胞依存性の抗体産生
- (C) 抗原抗体複合体の形成および脾臓での排除
 - ウイルスや細菌の増殖の抑制
 - 2次リンパ系器官による免疫応答の全般的な増強

感染防御は直接病原体と結合したり、間接的に補体系を活性化して行われる。さらに特異的抗体産生を増強して、効率よく感染を制御する。自然免疫の発動が獲得免疫への橋渡しとなる(文献2より引用)。

広範なレンジを示す特徴がある⁴⁾。

自然抗体はidiotypic-anti-idiotypic network theoryにおいて論じられた如くに、古くよりその存在と重要性が知られている⁷⁾が、その特異性の低さと不安定さのために、研究の対象から外されてきた感がある。しかし、自然抗体が種々の自己あるいは外来抗原に反応することにより、SLEやautoimmune hemolytic anemiaのような自己免疫疾患に深く関与しているであろう事は否定出来ないし、さらに、本来的に生体が感染や侵襲に対する初期防御機構の要として進化させてきた重要な防御因子である(表1)。

II. HIV感染病態

HIV-1に感染すると生体内ウイルス量は一過性の上昇(急性期感染)を示し、その後急速に減少する。この急性期感染に伴い産生される中和抗体やCTLなどの特異的免疫機構が奏効して抗ウイルス活性を発揮し、持続的な高度ウイルス増殖を一過性にくい止めていることが知られている。この低ウイルスレベルの無症候期は数年以上持続し、ある一定レベルのRNA量を保って経過する。また、HIV-1を感染したヒト体内では、毎日 1×10^{10} 個のウイルスが産生され続けており、そのウイルス感染に伴って、毎日約 2×10^9 個のCD4陽性T細胞が破壊され、そ

れと約同数のCD4陽性T細胞が新たに生産補給されていると算出されている⁸⁾。そのため、ある時期まではCD4陽性T細胞が十分に生産補給されるので無症候状態が保持できるが、年月と共に骨髄からの補給が疲弊して新生と破壊のバランスが崩れて壊滅的状态を招き、その結果AIDSを発症すると考えられる。さらに、HIV-1感染症におけるT細胞障害は、機能的障害と細胞数の減少が絡み合って存在する。機能障害として主なものに、IL-2-IL-2レセプターの発現異常や、細胞内でのgp120のCD4分子との会合によるCD4発現異常によるヘルパー機能阻害、nef蛋白によるMHCクラスI分子の発現抑制によるCTL機能発現阻害などがよく知られており、宿主の免疫監視機構からのエスケープを積極的に行っている⁹⁾。

III. HIV感染防御とその応用

HIV-1感染病態からも分かるように、生体はHIV-1感染を異常事態と認識して中和抗体活性やCTL活性を発動して長期に亘り抗ウイルス活性を発動している。

体細胞突然変異 (somatic mutation)

生体に存在する全細胞のうち、生殖細胞以外で起こる突然変異。この変異は子孫には伝達されないもので遺伝的意義はない。免疫グロブリン遺伝子では非常に高頻度に関与し、抗体の反応親和性を高める。

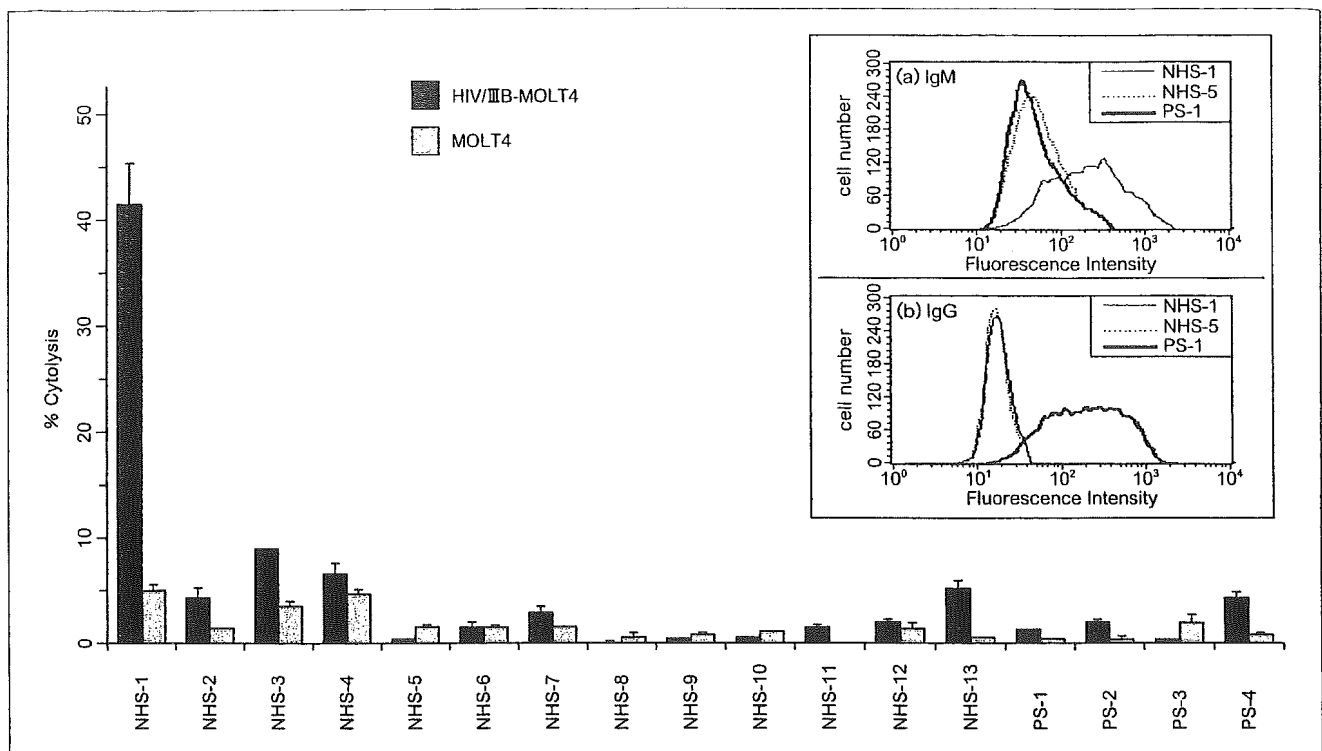


図1 HIV感染細胞に補体依存性細胞死を誘導する健康人血清中の自然抗体 (IgM)

HIV-ⅢB感染MOLT4細胞に対してHIV感染特異的に細胞死を誘導する健康人新鮮血清が存在し、その血清中には感染細胞に反応するIgM抗体が含まれていた。HIV急性感染患者血清中には感染細胞に反応するIgG抗体が多量に存在するが細胞死は誘導されない(文献18より引用)。

特に、感染者血清中の中和抗体活性の詳細な検討の結果より、重要な抗原エピートープの同定に基づいたモノクローナル抗体の開発研究が進行している。

抗体のみでどれ程の感染防御効果が期待できるのかは、チンパンジーやサルを用いた受動免疫実験により証明されており、中和抗体の*in vivo*での感染防御効果は明確である¹⁰⁾。中和抗体活性の多くはHIV-1膜蛋白gp120に対するものが重要であるという知見の集積により、多くの抗gp120モノクローナル抗体が開発検討されてきた。その中でも検討の進んでいるものに、F105抗体およびb12抗体と、2G12抗体がある。F105抗体は1991年にPosnerらによって、また、b12抗体は1994年にBurtonらにより開発されたヒトIgG₁モノクローナル抗体で、共に、gp120分子内のV3ループ中のCD4結合部

位にオーバーラップして不連続に存在する、よく保存された類似のエピートープを認識する中和抗体である^{11, 12)}。さらに、2G12抗体は1996年にTrkolaらにより開発されたヒトIgG₁モノクローナル抗体で、立体構造感受性で糖鎖構造依存性のよく保存されたgp120エピートープを認識する中和抗体である¹³⁾。これらの抗体は実験室株のみならず臨床株に対しても感染阻止効果を示す。さらに、これらの認識エピートープの異なる抗体の併用投与はサルとヒトの合子の子ウイルスであるSHIV (simian-human immunodeficiency virus) を用いたサルへの感染実験においても、より優れた感染抵抗性を示すことが確認された。

IV. 抗HIV抗体療法の進歩

HIV-1感染成立において不可欠な要素である膜貫通ドメインを有するgp41は、ウイルス粒子の状態ではgp120に覆われているために外部から認識されないが、感染時にgp120の立体構造の変化を受けて、その構造が認識できるようになる。2F5抗体は1993年にMusterらにより開発されたヒトIgG₃モノクローナル抗体で、gp41のエクトドメインにある特徴的なアミノ酸シーケンスELDKWASを認識する中和抗体である¹⁴⁾。このエピトープ部分はHIV-1が膜融合を起こすのに重要な役割を果たしており、この部分を含んだペプチドであるT20 (Fuzeon) にも強い抗HIV-1活性があり、臨床応用に進んでいる¹⁵⁾。特に、抗gp41抗体である2F5抗体と抗gp120抗体2剤およびT20との3剤併用は、さらに強い抗ウイルス活性を示すことが報告されている。また、SHIVを用いたサルにおける母子感染モデルにおいて、これらの3剤混合投与の効果が検討された。4頭の妊娠サルに抗体を投与し、分娩後にSHIVを静脈内投与しても完全に感染が阻止された。さらに、新生児サルに抗体を投与した後、SHIVを経口投与しても感染は完全に阻止された。これらの効果は治療からさらにワクチン応用のモデルに繋がると期待

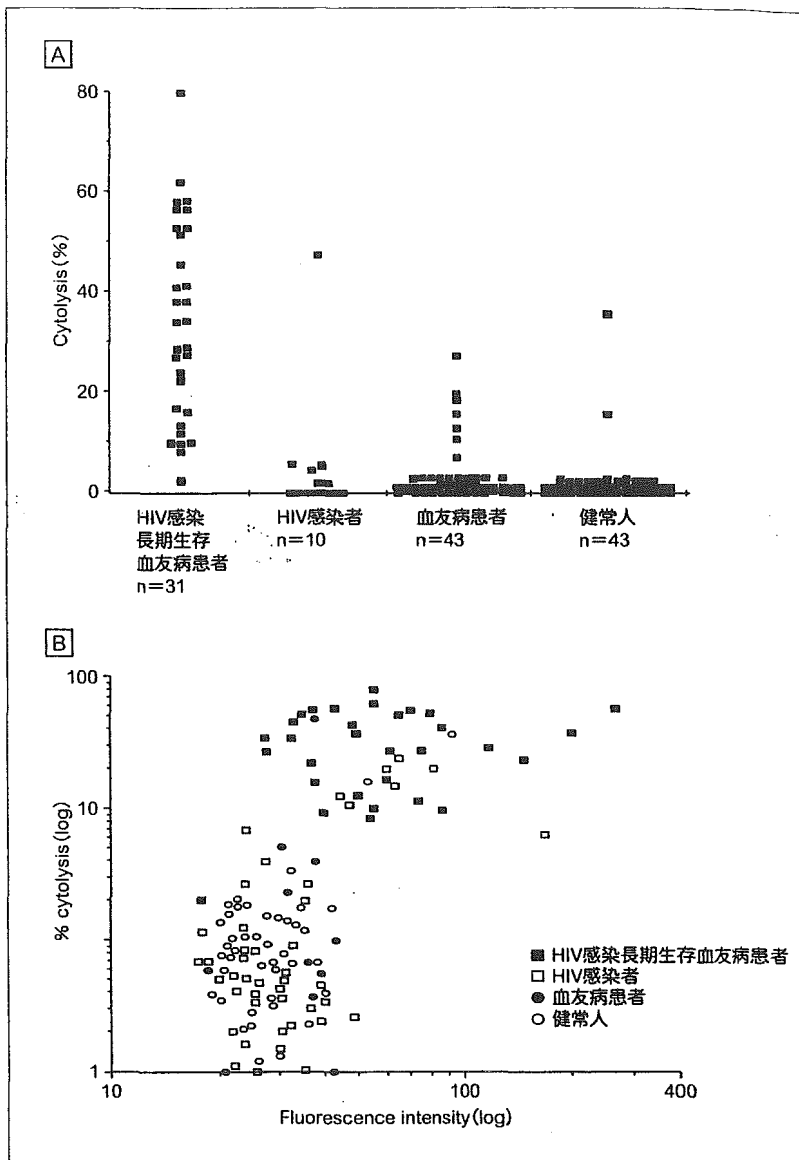


図2 HIV感染細胞に補体依存性細胞死を誘導するヒト血清

A HIV感染長期（10年以上）生存血友病患者、HIV感染者（3年位）、血友病および健常人の血清のHIV-ⅢB感染MOLT4細胞に対する補体依存性細胞傷害活性を検討した。

B これらの血清中の感染細胞反応性IgM抗体量をFACS解析した。感染細胞反応性IgM抗体量は細胞傷害活性との間に高い相関を認めた（文献20より引用）。

できる¹⁶⁾。さらに粘膜感染防御効果を高めるために、これらの抗体を遺伝子改変により分泌型抗体であるIgAやIgMに変換することで、より強力な感染阻止効果が期待されている¹⁷⁾。

V. 抗糖鎖IgM自然抗体による補体依存性感染細胞死

我々は健常人血清中の約2%にHIV-1感染細胞を補体反応依存的に破壊する活

gp41 (glycoprotein 41 of HIV)

HIVの膜タンパクはgp120とgp41で構成される。gp120はウイルスがCD4陽性細胞に結合するのに重要であり、その後、gp41の立体構造変化に伴ってウイルス膜と細胞膜との融合が起こり、感染が成立する。この膜融合のメカニズムはインフルエンザウイルスなどの他の膜ウイルスに共通に認められる。gp41の機能阻害は有効なHIV感染阻害効果を示す。

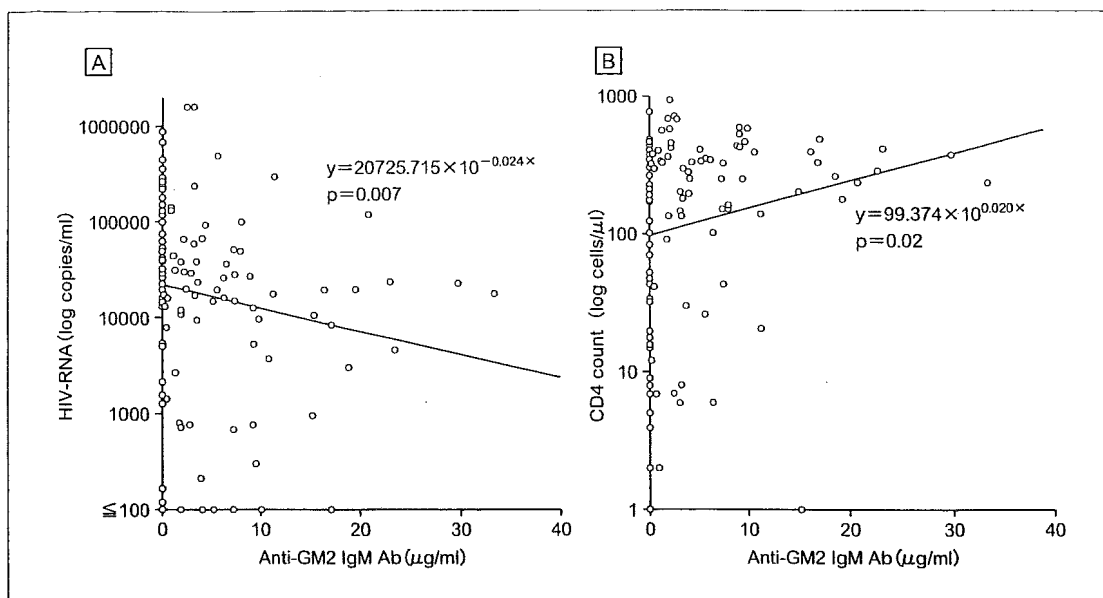


図3 HIV感染患者血清中の抗GM2-IgM抗体量とHIV-RNA量およびCD4陽性細胞数との相関

A HIV-RNA量と抗GM2-IgM抗体量の間には正の相関が認められる。

B CD4陽性細胞数と抗GM2-IgM抗体量の間には負の相関が認められる(文献21より引用)。

ガングリオシド (ganglioside)

スフィンゴ糖脂質のうちシアル酸を持つものの総称。脳神経系の細胞に高発現しており、神経突起の伸長などに関与している。免疫系の細胞ではGM3発現が認められる。細胞が癌化したり活性化されるとガングリオシドの糖鎖構造に変化が起こる。

性があることを見出した^{18, 19)}(図1)。また、HIV感染者の中でも、不幸にして頻回輸血により感染した血友病患者の中で、経過の良好であった10年以上長期生存者の血清を検討したところ、80%以上の血清でHIV感染細胞に対する強い細胞傷害活性が検出された。この傷害活性はHIV感染細胞に反応するIgM抗体量との間に高い相関を示した。さらに、これらのIgM抗体の多くは抗原としてガングリオシドGM2を認識することを確認した²⁰⁾(図2)。そこで、HIV-III B株を用いた感染細胞でのGM2発現をFACSにて解析したところ、感染細胞特異的にGM2抗原の膜への発現誘導が確認された。感染細胞の糖脂質解析を行った結果でも、中性糖脂質における糖脂質プロファイルは非感染細胞との間に大きな差異を認めなかったが、酸性糖脂質解析において、感染細胞における明瞭なGM2の発現誘導が確認されたので、HIV-III B株感染により誘導される糖脂質変化においては、

GM2発現がメジャーな変化であると結論された。細胞は種特異的の補体制御因子群を発現しており、補体反応から自身を保護しているが、HIV-1感染を受けると、特に膜傷害複合体形成阻止因子であるHRF20/CD59の顕著な発現低下が起こり、IgM抗体による強力な補体活性化能が優位となって、膜傷害複合体生成による細胞破壊が誘起されと考えられた¹⁸⁾。さらに、HIV感染患者血清中の抗GM2-IgM抗体量は、CD4カウントと正の相関を、また、HIV-RNAロードと負の相関を示し、感染者体内における、感染細胞反応性IgM抗体の重要性が示唆された²¹⁾(図3)。

VI. ヒト抗GM2-IgMモノクローナル抗体の感染防御効果

ヒトメラノーマ患者末梢リンパ球よりEBVを用いて樹立された、ヒト抗GM2-IgMモノクローナル抗体L55²²⁾を用いて、

抗HIV活性の検討を進めた。L55はヒト血清中自然抗体と同等の補体依存性細胞死を誘導できることが確認された。また、これらの抗GM2-IgM抗体は感染細胞のみならず、ウイルス粒子に対しても、強い溶解活性を示すことが判明した(図4)。感染母体と感染粒子の両方を同時に破壊することにより、有効な感染阻止効果が誘導されると期待され、実験室株での感染拡大に対して強力な阻止活性が得られた²³⁾。そこで、HIV感染者の末梢血リンパ球を用いた、*ex vivo*での抗HIV活性の検討を行った。5例の患者末梢血リンパ球よりCD8陽性細胞を除去した後L55を添加して、抗CD3抗体とIL-2存在下にリンパ球培養を行い、培養上清中のp24-HIVコア蛋白量を測定した。3例の患者リンパ球でウイルスの検出が可能となり、その3例全てにおいて、L55は感染拡大阻止効果を認めた。さらに、AZTの併用により、ウイルスは検出限界以下に抑制され、強力な相乗効果が認められた。このような、膜傷害活性を発現するモノクローナル抗体と中和抗体を組み合わせた抗体治療効果、あるいは化学療法との併用効果なども今後期待される^{24, 25)}。

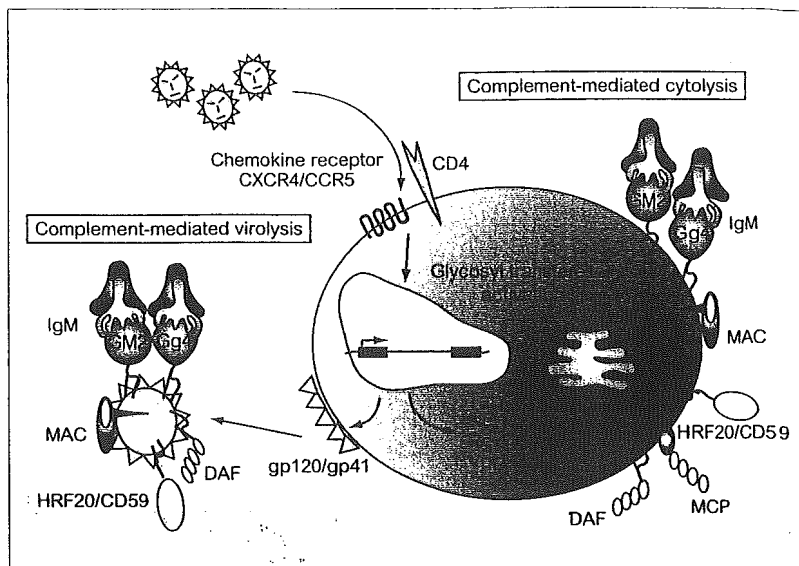


図4 抗糖鎖IgM抗体による抗HIV活性の概要
HIV感染により新たに発現誘導される糖鎖Gg4やガングリオシドGM2に対するIgM抗体が自然抗体として健康人血清中に存在する。これらのIgM抗体は補体制御膜因子の制御機能を打破して補体依存性の細胞死を誘導する。さらにウイルス粒子溶解も同時に誘導し強力な抗HIV活性を示す。モノクローナル抗体でも同様の活性が誘導できる。

VII. 潜伏感染細胞にアポトーシスを誘導するIgM抗体

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得るために、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むヒト染色体導入マウス (Trans-chromosome mouse, キリンビール社) を感染細胞で免疫して、抗体産生ハイブリドーマ2G9クローンを得た。ヒトIgM抗体2G9は、感染細胞特異的に反応するが、不思議なことに補体依存性の細胞傷害活性は全く誘導できない。しかし、補体存在下あるいは非存在下に問わず、2日間培養により、感染細胞が抗体反応依存的に死滅することが認められた。この細胞死はTUNEL法で検出されるDNA fragmentationを主徴としたアポトーシス死であることが確認された。2G9遺伝子の解析結果では、補体活性化能を有する他のIg遺伝子との間に、その定常領域に差異は認

補体依存性細胞死 (Complement dependent cytotoxicity)

補体活性化により補体膜傷害複合体 (MAC) が形成されて起こる細胞死。細胞膜にMACが膜貫通型のチャネルを形成するため、膜の恒常機能が保たれなくなって起こる細胞膜破壊により引き起こされる細胞死である。形態的にネクローシスに分類されることが多い。膜損傷が軽度であれば、プロテインキナーゼCなどの活性化に伴う細胞内シグナル伝達により抗アポトーシス作用が働き修復に向かうが、膜損傷が激しいとアポトーシスが協同的に働いて異常細胞を排除するようになる。

アポトーシス (apoptosis)

細胞死は形態学的に、アポトーシスとネクローシスに分類される。アポトーシス死は細胞核の凝縮、DNA断片化、細胞膜のプレビング、細胞骨格系の崩壊などにより細胞の収縮が起こる特徴を有する細胞死である。個体の発生や恒常性の維持に必須の生理現象である。ウイルス感染や癌化などの異常細胞を排除する生体防御機構でもある。

められておらず、この抗体の生物活性の違いには、抗原分子のオリエンテーションが影響を及ぼしているものと推察される。2G9は潜伏感染細胞OM10.1にも反応性を示し、アポトーシスを誘導できるので、HIVがプロウイルス化して潜んでいる細胞をも認識して、生体から排除できる可能性を示唆しているものと期待できる²⁶⁾。現在、2G9抗原分子の解析を進めている。

まとめ

AIDS治療を目指しての免疫学的治療法の開発は、HIV-1ウイルスの特異的エピトープをねらって行われてきた。しかし、中和抗体の例でよく知られるように、HIV-1の高度変異性によって長期的な有効治療が困難となる問題が挙げられる。これは、化学療法においても同様であり、治療の長期化や不完全性は更なる耐性ウイルスの生産を加速することに繋がる。したがって、ウイルス感染によって2次的に誘導される異常を標的にしたり、あるいは、ケモカインレセプターなどの生体側の分子を標的にした抗体の適用も試行されている。我々は、ガングリオシドGM2を中心として、感染細胞に反応するIgM抗体の重要性を検証してきた。また、感染の初期段階に発現するnef蛋白やHIV-1感染による細胞膜変化を標的と

した更なる細胞死誘導型抗体の作成も試みている²⁷⁾。さらに、潜伏感染細胞の検出と排除への挑戦がクローズアップされ始めており、感染症の制御がさらなる進歩を遂げるものと期待している。

IgM抗体は現存する最強の補体活性化蛋白であると同時に、抗原分子の強力なクロスリンカーとして細胞内にシグナルを誘導する蛋白でもある。感染症や悪性腫瘍などへの広範な応用が可能であり、IgM抗体の生物活性を有効に引き出すための研究とテクノロジーの進歩が必要である。

参 考 文 献

- 1) Lann ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 311-40.
- 2) Ochsenbein AF, and Zinkernagel RM. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 624-30.
- 3) Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, *et al.* B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 2000; 192: 271-80.
- 4) Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnosthi seauton'. *Immunol Today* 1991; 12: 154-9.
- 5) Haury M, Sundbald A, Barreau C, *et al.* The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1557-63.
- 6) Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, *et al.* Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 1999; 286: 2156-9.
- 7) Coutinho A. Beyond clonal selection and network. *Immunol Rev* 1989; 110: 63-87.
- 8) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-6.
- 9) McCune JM. The dynamics of CD4 positive T cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410: 974-9.
- 10) Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, *et al.* Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SHV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Mat Med* 1999; 5: 204-10.
- 11) Posner MR, *et al.* An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1 gp120, inhibits virus binding to cell, and neutralized infection. *J Immunol* 1991; 146: 4325-32.
- 12) Burton DR, Pyati J, Kodwi R, *et al.* Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 1994; 266: 1024-1027.
- 13) Trkola A, Purtscher M, Muster T, *et al.* Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996; 70: 1100-8.
- 14) Muster T, Steindl F, Purtscher M, *et al.* A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67: 6642-7.
- 15) Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, *et al.* Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Mat Med* 1998; 4: 1302-7.
- 16) Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 2000; 6: 200-6.
- 17) Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H. Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol* 2003; 77: 4095-103.
- 18) Wu X, Okada N, Iwamori M, and Okada H. IgM natural antibody against an asialo-oligosaccharide, gangliotetraose (Gg4) sensitizes HIV-1 infected cells for cytolysis by homologous complement. *Int Immunol* 1996; 8: 153-8.
- 19) Okada H, Wu X, and Okada N. Complement-mediated cytolysis and azidothymidine are synergistic in HIV-1 suppression. *Int Immunol* 1998; 10: 91-6.
- 20) Okada N, Wu X, and Okada H. Presence of IgM antibodies which sensitize HIV-1 infected cells to cytolysis by homologous complement in long term survivors of HIV-infection. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 331-6.
- 21) Wu X, Okada N, Goto M, Iwamoto A, and Okada H. The IgM antibody level against ganglioside GM2 correlates to the disease status of HIV-1 infected patients. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 405-10.
- 22) Nishinaka Y, Ravindranath MH, and Irie RF. Development of a human monoclonal antibody to ganglioside GM2 with potential for cancer treatment. *Cancer Res* 1996; 56: 5666-71.
- 23) Wu X, Okada N, Momota H, *et al.* Complement-mediated anti-HIV-1 effect induced by human IgM monoclonal antibody against ganglioside GM2. *J Immunol* 1999; 152: 533-9.
- 24) Okada N, Wu X, Mizokami M, Irie RF, and Okada H. Human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM2 and complement suppress virus propagation in *ex vivo* cultures of lymphocytes from HIV-1 infected patients. *Microbiol Immunol* 1999; 43: 723-7.
- 25) Okada N, and Okada H. Human IgM antibody therapy for HIV-1 infection. *Microbiol Immunol* 1999; 43: 729-36.
- 26) 岡田則子, Yin S, 岡田秀親. HIV-1 感染拡大を阻止するヒトIgMモノクローナル抗体. 第16回日本エイズ学会学術集会抄録集 2002; 16: 221.
- 27) Kawai M, He L, Kawamura T, Omoto S, Fujii YR, and Okada N. Chimeric human/murine monoclonal IgM antibodies to HIV-1 Nef antigen expressed on chronically infected cells. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 247-53.

特集●抗体医療の最近の進歩

AIDSに対する抗体療法

岡田則子

開発が進む新規抗体療法

AIDS に対する抗体療法

岡田則子

HIV-1 感染症である AIDS 病態の解明に伴い、その治療法も逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤の開発から、それに続く多剤併用療法 (HAART) へと進化している。これにより、数年前まで死の病であった AIDS は、制御可能な病気へと変貌した。さらに、間歇投与療法 (SIT) が施行されるに及び、感染初期段階に化学療法と個体の免疫力を有効に誘導利用することで、ウイルス増殖を制御することが可能となり、さらに慢性感染細胞を排除することにより、AIDS 完治へ向けての新たな免疫賦活法や抗体療法に期待が寄せられる。

Key words HIV-1, AIDS, antibody, IgM, complement

HIV-1 感染病態

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) に感染すると生体内ウイルス量は一過性の上昇 (急性期感染) を示し、その後急速に減少する。この急性期感染に伴い産生される中和抗体や細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などの特異的免疫機構が奏効して抗ウイルス活性を発揮し、持続的な高度ウイルス増殖を一過性にくい止めていることが知られている。この低ウイルスレベルの無症候期は数年以上持続し、ある一定レベルの RNA 量を保って経過する。また、HIV-1 に感染したヒト体内では、毎日 1×10^{10} 個のウイルスが産生され続けており、そのウイルス感染に伴って、毎日約 2×10^9 個の $CD4^+$ T 細胞が破壊され、それと約同数の $CD4^+$ T 細胞が新たに生産補給されていると算出されている¹⁾。そのため、ある時期までは $CD4^+$

T 細胞が十分に生産補給されるので無症候状態が保持できるが、年月とともに骨髄からの補給が疲弊して新生と破壊のバランスが崩れて壊滅的状态を招来し、その結果 AIDS を発症すると考えられる。さらに、HIV-1 感染症における T 細胞傷害は、機能的障害と細胞数の減少がからみ合って存在する。機能障害として主なものに、IL-2-IL-2 レセプターの発現異常や、細胞内での gp120 の $CD4$ 分子との会合による $CD4$ 発現異常によるヘルパー機能阻害、Nef タンパク質による MHC クラス I 分子の発現抑制による CTL 機能発現阻害などがよく知られており、宿主の免疫監視機構からのエスケープを積極的に行っている²⁾。

中和抗体療法

HIV-1 感染病態からもわかるように、生体は

Antibody therapy for AIDS

Noriko Okada

名古屋市立大学医学部生体高分子部門

おかだ・のりこ 1970 年共立薬科大学卒業。三共(株)中央研究所、北里研究所、東京大学医科学研究所研究員を経て、83 年より福岡大学助手、助教授を務める。95 年名古屋市立大学医学部生体高分子部門助手、98 年同助教授 (現在に至る)。研究テーマは生体防御機構における補体系の重要性和感染防御抗体の研究。

HIV-1感染を異常事態と認識して中和抗体活性やCTL活性を発動して長期にわたって抗ウイルス活性を発動している。特に、感染者血清中の中和抗体活性の詳細な検討の結果より、重要な抗原エピトープの同定に基づいたモノクローナル抗体の開発研究が進行している。

1. 抗gp120モノクローナル抗体

抗体のみでどれほどの感染防御効果が期待できるのかは、チンパンジーやサルを用いた受動免疫実験により証明されており、中和抗体の*in vivo*での感染防御効果は明確である³⁾。中和抗体活性の多くはHIV-1膜タンパク質gp120に対するものが重要であるという知見の集積により、多くの抗gp120モノクローナル抗体が開発検討されてきた。そのなかでも検討の進んでいるものに、F105抗体およびb12抗体と2G12抗体がある。F105抗体は1991年にPosnerらによって、また、b12抗体は1994年にBurtonらにより開発されたヒトIgG1モノクローナル抗体で、ともに、gp120分子内のV3ループ中のCD4結合部位にオーバーラップして不連続に存在する、よく保存された類似のエピトープを認識する中和抗体である^{4,5)}。さらに、2G12抗体は1996年にTrkolaらにより開発されたヒトIgG1モノクローナル抗体で、立体構造感受性で糖鎖構造依存性のよく保存されたgp120エピトープを認識する中和抗体である⁶⁾。これらの抗体は、実験室株のみならず臨床株に対しても感染阻止効果を示す。さらに、これらの認識エピトープの異なる抗体の併用投与はサルとヒトの合いの子ウイルスであるSHIV (simian-human immunodeficiency virus) を用いたサルへの感染実験においても、より優れた感染抵抗性を示すことが確認された。

2. 抗gp41モノクローナル抗体と併用効果

HIV-1感染成立において不可欠な要素である膜貫通ドメインを有するgp41は、ウイルス粒子の状態ではgp120に覆われているために外部から認識されないが、感染時にgp120の立体構造の変化を受けて、その構造が認識されるようになる。2F5抗体は1993年にMusterらにより開発されたヒトIgG3モノクロ

ナル抗体で、gp41のエクトドメインにある特徴的なアミノ酸配列ELDKWASを認識する中和抗体である⁷⁾。このエピトープ部分はHIV-1が膜融合を起こすのに重要な役割を果たしており、この部分を含んだペプチドであるT20 (Fuzeon) にも強い抗HIV-1活性があり、臨床応用が進んでいる⁸⁾。特に、抗gp41抗体である2F5抗体と抗gp120抗体2剤との3剤併用は、さらに強い抗ウイルス活性を示すことが報告されている。また、SHIVを用いたサルにおける母子感染モデルにおいて、これらの3剤混合投与の効果が検討された。4頭の妊娠サルに抗体を投与し、分娩後にSHIVを静脈内投与しても完全に感染が阻止された。さらに、新生仔サルに抗体を投与した後、SHIVを経口投与しても感染は完全に阻止された。これらの効果は治療からさらにワクチン応用のモデルにつながると期待できる⁹⁾。さらに粘膜感染防御効果を高めるために、これらの抗体を遺伝子改変により分泌型抗体であるIgAやIgMに変換することで、より強力な感染阻止効果が期待されている¹⁰⁾。

抗糖鎖IgM自然抗体による補体依存性感染細胞死

筆者らは約2%の健常人血清中にHIV-1感染細胞を補体反応依存的に破壊する活性があることを見出した^{11,12)}。また、HIV感染者のなかでも、不幸にして頻回輸血により感染した血友病患者で経過の良好であった10年以上長期生存者の血清を検討したところ、80%以上の患者血清にHIV感染細胞に対する強い細胞傷害活性が検出された。この傷害活性はHIV感染細胞に反応するIgM抗体量との間に高い相関を示した(図1)。さらに、これらのIgM抗体の多くは抗原としてガングリオシドGM2を認識することを確かめた¹³⁾。そこで、HIV-III B株を用いた感染細胞でのGM2発現をFACSにて解析したところ、感染細胞特異的にGM2抗原の膜への発現誘導が確認された。感染細胞の糖脂質解析を行った結果でも、中性糖脂質における糖脂質プロファイルは非感染細胞との間に大きな差異を認めなかったが、酸性糖脂質解析において感染細胞における明瞭なGM2の発

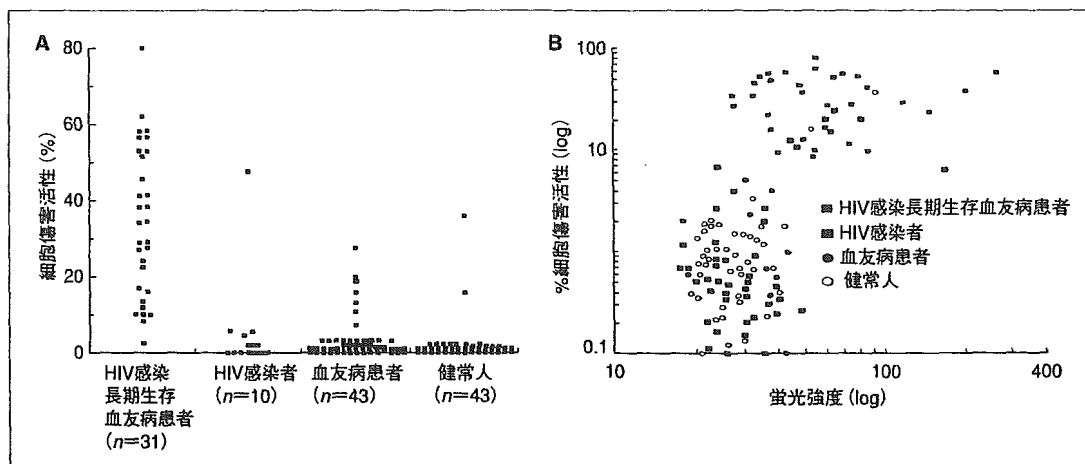


図1 HIV感染細胞に補体依存性細胞死を誘導するヒト血清

A: HIV感染長期生存(10年以上)血友病患者, HIV感染者(3年くらい), 血友病患者および健康人の血清のHIV-ⅢB感染MOLT4細胞に対する補体依存性細胞傷害活性を検討した。

B: Aの血清中の感染細胞反応性IgM抗体量をFACS解析した。感染細胞反応性IgM抗体量は細胞傷害活性との間に高い相関を認めた。

(Okada N et al: *Microbiol Immunol* 41, 331-6, 1997¹³⁾ より)

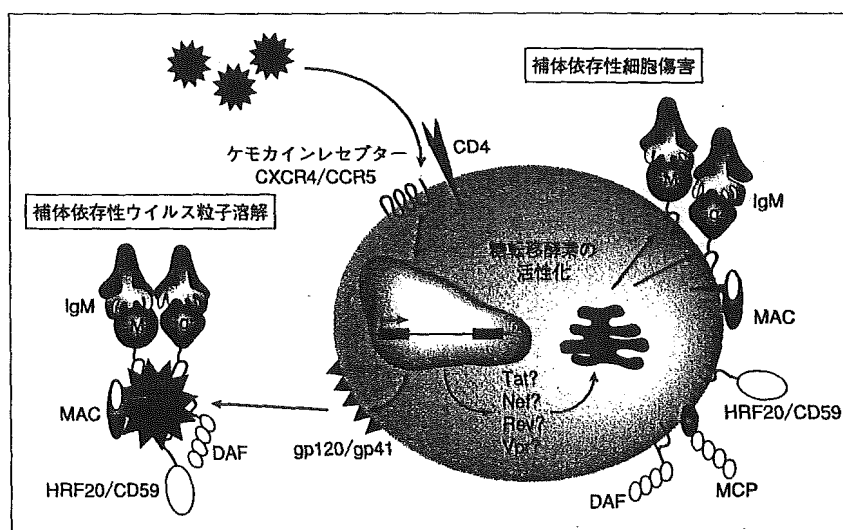


図2 抗糖鎖IgM抗体による抗HIV活性

HIV感染により新たに発現誘導される糖鎖Gg4やガングリオシドGM2に対するIgM抗体が自然抗体として健康人血清中に存在する。これらのIgM抗体は補体制御膜因子の制御機能を打破して補体依存性の細胞死を誘導する。さらにウイルス粒子溶解も同時に誘導し強力な抗HIV活性を示す。モノクローナル抗体でも同様の活性が誘導できる。

現誘導が確認されたので、HIV-ⅢB株感染により誘導される糖脂質変化においては、GM2発現がメジャーな変化であると結論された。

細胞は種特異的補体制御膜因子群を発現しており、補体反応から自身を保護しているが、HIV-1感染を受けると、特に膜傷害複合体形成阻止因子であるHRF20/CD59の顕著な発現低下が起こり、IgM

抗体による強力な補体活性化能が優位となって、膜傷害複合体生成による細胞破壊が誘起されると考えられた(図2)¹¹⁾。さらに、HIV感染患者血清中の抗GM2-IgM抗体量は、CD4カウントと正の相関を、またHIV-RNAロードと負の相関を示し、感染者体内における感染細胞反応性IgM抗体の重要性が示唆された¹⁴⁾。

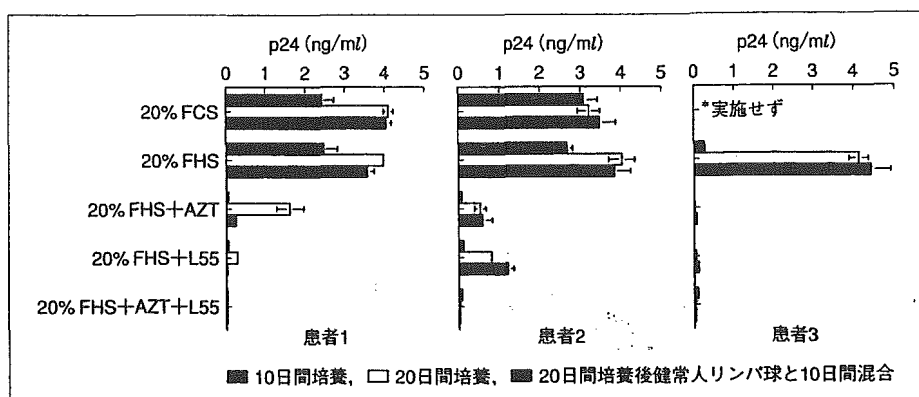


図3 HIV感染患者末梢血リンパ球を用いたヒト抗GM2-IgMモノクローナル抗体L55の抗HIV活性

患者末梢血よりCD8⁺細胞を除去した後、抗CD3抗体とIL-2存在下にリンパ球培養を行った。L55 50 µg/ml添加培養により、培養上清中のp24抗原量はAZT 1 µM添加培養と同等に抑制された。さらに、L55とAZTの混合添加培養により完全に抑制された。

FCS：ウシ胎仔血清、FHS：新鮮ヒト血清

(Okada N et al: *Microbiol Immunol* 43, 723-7, 1999¹⁷⁾ より)

ヒト抗GM2-IgMモノクローナル抗体の感染拡大阻止効果

ヒトメラノーマ患者末梢血リンパ球より Epstein-Barr ウイルス (EBV) を用いて樹立された、ヒト抗GM2-IgMモノクローナル抗体L55¹⁵⁾を用いて、抗HIV活性の検討を進めた。L55はヒト血清中自然抗体と同等の細胞傷害活性を誘導できることが確認された。また、これらの抗GM2-IgM抗体は感染細胞のみならず、ウイルス粒子に対しても強い溶解活性を示すことが判明した(図2)。感染母体と感染粒子の両方を同時に破壊することにより、有効な感染阻止効果が誘導されると期待され、実験室株での感染拡大に対して強力な阻止活性が得られた¹⁶⁾。

そこで、HIV感染者の末梢血リンパ球を用いた、*ex vivo*での抗HIV活性の検討を行った。5例の患者末梢血リンパ球よりCD8⁺細胞を除去した後にL55を添加して、抗CD3抗体とIL-2存在下にリンパ球培養を行い、培養上清中のp24 HIVコアタンパク質量を測定した。3例の患者リンパ球でウイルスの検出が可能となり、その3例すべてにおいて、L55は感染拡大阻止効果を認めた。さらに、アジドチミジン (AZT) の併用によりウイルスは検出限界以下に

抑制され、強力な相乗効果が認められた(図3)。このような、膜傷害活性を発現するモノクローナル抗体と中和抗体を組み合わせた抗体治療効果、あるいは化学療法との併用効果なども今後期待される^{17,18)}。

慢性感染細胞にアポトーシスを誘導するモノクローナル抗体

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得るために、ヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子を含むヒト染色体導入マウス(Trans-Chromo mouseTM, TCマウス, キリンビール社)を感染細胞で免疫して、抗体産生ハイブリドーマ2G9クローンを得た。ヒトIgM抗体2G9は、感染細胞特異的に反応するが、補体依存性の細胞傷害活性はまったく誘導できない“ダメ抗体”であった。しかし、3日間の培養により感染細胞が死滅することが認められ、TUNEL法で検出されるDNA fragmentationを主徴とするアポトーシス死であることが確認された。2G9遺伝子の解析結果では、補体活性化能を有するIg遺伝子との間に差異は認められておらず、この抗体の生物活性の違いには、抗原分子のオリエンテーションが影響を及ぼしているものと推察される。2G9は潜伏感染細胞OM10.1にも反応

性を示し、アポトーシスを誘導できるので、HIVがプロウイルス化して潜んでいる細胞をも認識して、生体から排除できる可能性を示唆しているものと期待できる¹⁹⁾。現在、2G9抗原分子の解析を進めている。

抗HIV-1治療を目指してのモノクローナル抗体の開発は、HIV-1ウイルスの特異的エピトープをねらって行われてきた。しかし、中和抗体の例でよく知られるように、HIV-1の高度変異性によって長期的な有効治療が困難となる問題があげられる。これは、化学療法においても同様であり、治療の長期化や不完全性はさらなる耐性ウイルスの生産を加速することにつながる。よって、ウイルス感染によって二次的に誘導される異常を標的にしたり、あるいはケモカインレセプターなどの生体側の分子を標的にした

抗体の適用も試行されている。筆者らは、ガングリオシドGM2を中心として、感染細胞に反応するIgM抗体の重要性を検証してきた。また、初期感染に発現するNefタンパク質やHIV-1感染による細胞膜変化を標的としたさらなる細胞死誘導型抗体の作製も試みている²⁰⁾。

HAART (highly active antiretroviral therapy) からSIT (structured intermittent treatment) へとHIV-1治療に化学療法プラス免疫療法への道が開拓されてきており、ワクチン開発においてもモノクローナル抗体の適用は重要な要素となろう。HIV-1のプロウイルス化潜伏感染が免疫攻撃の標的になりうるのか、そして、有効な標的分子は何か、が最重要課題である。

文献

- 1) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-6 (1995)
- 2) McCune JM. The dynamics of CD4 positive T cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974-9 (2001)
- 3) Shibata R, Igarashi T, Haigwood N et al. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SHV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* **5**, 204-10 (1999)
- 4) Posner MR, Hideshima T, Cannon T et al. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunol* **146**, 4325-32 (1991)
- 5) Burton DR, Pyati J, Kodwi R et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**, 1024-7 (1994)
- 6) Trkola A, Purtscher M, Muster T et al. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1100-8 (1996)
- 7) Muster T, Steindl F, Purtscher M et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**, 6642-7 (1993)
- 8) Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-7 (1998)
- 9) Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R et al. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**, 200-6 (2000)
- 10) Wolbank S, Kunart R, Stiegler G & Katinger H. Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol* **77**, 4095-103 (2003)
- 11) Wu X, Okada N, Iwamori M & Okada H. IgM natural antibody against an asialo-oligosaccharide, ganglioside (Gg4) sensitizes HIV-1 infected cells for cytolysis by homologous com-

- plement. *Int Immunol* 8, 153-8 (1996)
- 12) Okada H, Wu X & Okada N. Complement-mediated cytotoxicity and azidothymidine are synergistic in HIV-1 suppression. *Int Immunol* 10, 91-6 (1998)
 - 13) Okada N, Wu X & Okada H. Presence of IgM antibodies which sensitize HIV-1 infected cells to cytotoxicity by homologous complement in long term survivors of HIV-infection. *Microbiol Immunol* 41, 331-6 (1997)
 - 14) Wu X, Okada N, Goto M, Iwamoto A & Okada H. The IgM antibody level against ganglioside GM2 correlates to the disease status of HIV-1 infected patients. *Microbiol Immunol* 44, 405-10 (2000)
 - 15) Nishinaka Y, Ravindranath MH & Irie RF. Development of a human monoclonal antibody to ganglioside GM2 with potential for cancer treatment. *Cancer Res* 56, 5666-71 (1996)
 - 16) Wu X, Okada N, Momota H, Irie RF & Okada H. Complement-mediated anti-HIV-1 effect induced by human IgM monoclonal antibody against ganglioside GM2. *J Immunol* 162, 533-9 (1999)
 - 17) Okada N, Wu X, Mizokami M, Irie RF & Okada H. Human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM2 and complement suppress virus propagation in *ex vivo* cultures of lymphocytes from HIV-1 infected patients. *Microbiol Immunol* 43, 723-7 (1999)
 - 18) Okada N & Okada H. Human IgM antibody therapy for HIV-1 infection. *Microbiol Immunol* 43, 729-36 (1999)
 - 19) 岡田則子, Yin S, 岡田秀親. HIV-1感染拡大を阻止するヒトIgMモノクローナル抗体. 第16回日本エイズ学会学術集会抄録集 16, 221 (2002)
 - 20) Kawai M, He L, Kawamura T et al. Chimeric human/murine monoclonal IgM antibodies to HIV-1 Nef antigen expressed on chronically infected cells. *Microbiol Immunol* 47, 247-53 (2003)