

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590478

研究課題名(和文) エイズウイルスに対する中和抗体の新しい作用機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of a new mechanism of neutralizing antibodies against HIV-1

研究代表者

原田 信志 (HARADA SHINJI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：60173085

研究成果の概要：脂質二重膜である HIV-1 エンベロープの流動性を薬物等で低下させると、HIV-1 の感染は抑制される。HIV-1 の gp120 に附着し HIV-1 を中和する抗体は、エンベロープ流動性を低下させた。また、HIV-1 上の非特異的蛋白を認識する抗体では、HIV-1 を中和すれば、エンベロープの流動性を低下させた。以上より、HIV-1 特異的あるいは非特異的蛋白を認識する抗体は、中和抗体であれば、その附着によりエンベロープの流動性を抑制した。これはウイルスの新しい中和機序であると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ワクチン、中和抗体、エイズ

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでいくつかの糖脂質や HTLV-I トランスフォーム細胞株の培養上清が HIV-1 の感染を修飾することを見だし、その機序を追求してきた。これらの研究から、HIV-1 の感染性の変化は、さまざまな物質によって HIV-1 の使用するレセプターおよびコレセプターが質的かつ量的に修飾させられるためと考えるに至った。植物由来の糖脂質であるファテピラシン A1 やカプシアノサイド G はその細胞処理方法により HIV-1 の感染が

大きく変わった。特に、カプシアノサイド G は、細胞を感染前に処理することにより、CXCR4 をコレセプターとして使用する X4 株 HIV-1 の感染を著しく亢進させた。その処理により細胞の CD4 と CXCR4 の発現が増強することはなかった。しかし、カプシアノサイド G は CD4 と CXCR4 の細胞表面での共集合と capping を誘導し、CD4 と CCR5 には影響をあたえなかった。このカプシアノサイド G の選択的作用が X4 HIV-1 株の感染だけを増強させる原因であると考えた。これらの研究により、細胞

表面でのレセプター群の動きと集合が HIV-1 の感染を促進させるとの結論に至った。これは HIV-1 が複数の gp120/receptors 複合体を利用してウイルスの侵入と感染を成立させる (multiple-site binding) の可能性を示唆していた。また、HIV-1 の gp120 V3 部位を認識するモノクローナル抗体 0.5 は、1 分子で 1 個の HIV-1 を中和することを報告し、この現象は 0.5 の結合が HIV-1 エンベロープに構造的変化を与えるためと考えた。このことで、HIV-1 の感染には multiple-site binding が必要であり、ウイルスの中和にはレセプターへの吸着阻止以外の作用機序があるとの考えに至った。さらに糖脂質様の物質グリチルリチンがウイルス粒子に直接作用し、ウイルスエンベロープの流動性を下げることにより、ウイルスの感染性を低下させることを報告した。以上の理由で、膜流動性を低下させ multiple-site binding 形成を阻止し感染を抑制するという機序は、中和抗体でも起こり得るのではないかという考えに至った。

HIV-1 の中和抗体の研究は、米国では抗体や gp120 の構造から、その付着状態の解析がすすめられている。また、欧米では、分子生物学的手法から、ほとんどの抗体が吸着阻止として作用していることが明らかにされた。しかし、実際のウイルスと細胞を用いた中和抗体測定系では、吸着後の感染阻止 post-attachment neutralization (PAN) や、1 分子の抗体が 1 ビリオンを中和可能なことなど、吸着阻害では説明できない現象が、我々及び英国のグループから報告されている。今のところエンベロープの steric change のためなどと曖昧な説明がなされているが、なぜこのような現象が起こるかまだ解明されていない。

2. 研究の目的

エイズウイルスである HIV-1 の感染による宿主応答にウイルス蛋白に対する抗体産生がある。その中でもウイルス中和抗体は感染防御という意味で重要な獲得免疫のひとつである。一般的な中和抗体の作用機序として；a) ウイルスの抗体による凝集、b) ウイルスの細胞への吸着阻止、c) ウイルスの細胞内への侵入阻止、d) ウイルス脱殻の阻害、などが理論的に考えられている。しかしながら、HIV-1 に対して中和能力を示す抗体のほとんどは、HIV-1 のエンベロープ糖蛋白スパイクである gp120 の CD4 結合部位があるいは gp120 の可変部位である V3 を認識する抗体である。両方の抗体とも HIV-1 の細胞レセプターへの付着を阻害することによる感染阻止であるため、それが HIV-1 中和の主な作用機序であると考えられている。しかし、抗 V3 抗体にはウイルス吸着後に作用させても中和作用が見られ

ること、また 1 分子の抗体で 1 ビリオンの HIV-1 を中和可能なことなどの現象がある。本研究では、まず抗 V3 中和抗体が吸着阻止以外の機序で HIV-1 を中和すること、HIV-1 エンベロープに存在する細胞由来の蛋白でも中和の標的抗原になることを証明する。このような抗体の中和作用は、これまでエンベロープに steric な変化がおこるためと曖昧に推定されていた。しかし、本研究では抗体のもっと具体的な感染防止作用機序として、レセプター/gp120 の膜上の動きによって形成される multiple-site binding (fusion pore) 形成阻止を証明し、抗体による感染防止の新しい機構を追究する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞とウイルス；細胞は MOLT-4、MT-2、MAGI 細胞などを使用した。ウイルスとして X4 HIV-1 のクローン株である C-2 やその 0.5 逃避ウイルスなどを用いた。また、X4 のエンベロープをもった pseudovirus である pNL43-luc も中和実験に使用した。
- (2) 単クローン抗体；HIV-1 の gp120 に作用する 0.5 (anti-V3)、694/98-D (anti-V3)、670-30D (anti-C5) と anti-gp41 である 246-D を用いた。また、HTLV-I gp46 に対する中和単クローン抗体 LAT27 と非中和抗体 LAT12 および抗 HLA-II 抗体を使用した。
- (3) ウイルス中和価の測定；ウイルスと抗体を作用させ、すぐ細胞と混和した。37 で 1 時間培養した後、洗浄し、さらに 37 で 2 日間培養した。残存ウイルスの感染価は MAGI アッセイか pNL43-luc ウイルスを使った場合はルシフェラーゼ価を測定して決定した。
- (4) 吸着後中和価 post-attachment neutralization (PAN) の測定；ウイルスを細胞に 37、1 時間作用させ、洗浄後、希釈した抗体を 37、1 時間反応させる。洗浄後、細胞を 37、2 日間培養し、中和抗体価測定と同様に、残存 HIV-1 感染価をルシフェラーゼを測定することにより行う。
- (5) 膜流動性の測定；約 50ml のウイルス溶液に 5-doxyl stearic acid (5-DSA) を反応させ、ウイルスを濃縮洗浄後、キャピラリーに封じこめた。エンベロープ膜の流動性は、ラベルに用いた 5-DSA の電子の揺れを電子スピン共鳴 (ESR) 法で測定することにより行った。ESR で得られた値で order parameter (S) を計算した。S 値が高いほど、膜流動性は低く、S 値が低いと流動性は高いと判定された。

4. 研究成果

- (1) anti-V3、anti-C5、anti-gp41 単クローン抗体の HIV-1 中和と PAN；X4 のエンベロープに作用する 0.5 と 694/98-D (anti-V3)、670-30D (anti-C5)、264-D (anti-gp41) 抗体の X4 HIV-1 に対する中和能と PAN 活性について調べた。図 1 に示すように anti-V3 である

694/98-D 抗体のみが X4 HIV-1 に対して強い中和活性を示した。しかし、anti-C5 と anti-gp41 抗体は HIV-1 の感染を抑制せず、

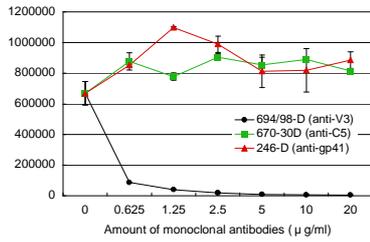


図1 単クローン抗体の中和活性

むしろ亢進する傾向が認められた。もうひとつの anti-V3 抗体である 0.5 も同様に強い中和活性を示した。従って、anti-V3 抗体は中和抗体であり、anti-C5 と anti-gp41 抗体は感作抗体である。これらの抗体の PAN 活性を調べたが、中和活性と同様に、anti-V3 抗体だけに PAN が認められた。

- (2) anti-V3、anti-C5、anti-gp41 単クローン抗体のウイルスのエンベロープ膜への作用； anti-V3 抗体が PAN 作用を示したことから、anti-V3 抗体には HIV-1 の吸着阻止だけでなく、エンベロープに何らかの作用を与えるものと考えられた。そこで、これらの抗体のエンベロープの膜流動性へ与える影響を調べた(図2)。中和と PAN 活性を示した anti-V3

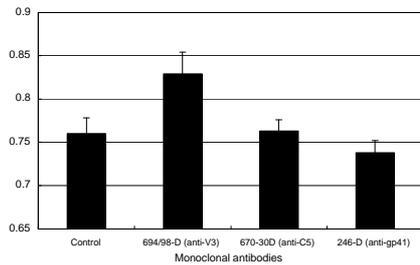


図2 単クローン抗体の HIV-1 エンベロープ流動性へ与える影響

抗体である 694/98-D は order parameter である S 値がコントロールより高く、この抗体が膜の流動性を抑えていることが分かった。しかし、中和反応を示さない anti-C5 と anti-gp41 抗体はこのような膜流動性抑制作用は認められなかった。また、同様に anti-V3 である 0.5 抗体は感受性ウイルス株である C-2 のエンベロープの流動性を抑えたが、0.5 の逃避ウイルスのエンベロープ流動性には影響を与えなかった。以上の結果、HIV-1 特異的蛋白を認識する単クローン抗体では、その抗体の中和および PAN 能と膜流動性抑制能とは関連が認められた。

- (3) エンベロープ上に存在する HIV-1 非特異的分子を認識する抗体の HIV-1 中和作用；抗体として HIV-1 関連分子を認識する anti-V3 のようなものを使っている限り、HIV-1 の中和作用として吸着阻害を否定することはできないし、そこで HIV-1 のエンベロープ上に存在し、宿主細胞由来の分子を標的として、そ

れを認識する抗体が HIV-1 の中和活性を有するか検討した。用いたウイルスは X4 HIV-1 のクローンウイルスである C-2 を MOLT-4 細胞あるいは MT-2 細胞に感染させ回収した子孫ウイルスを使用した。それぞれ C-2(MOLT-4)、C-2(MT-2)ウイルスと呼ぶことにした。MT-2 細胞は、MOLT-4 細胞と異なり、細胞膜上に HLA-II 分子と HTLV-I gp46 を発現している。従って、MT-2 細胞から産生された C-2(MT-2)ウイルスはエンベロープ上に HLA-II 分子と HTLV-I gp46 を持っている。図3は抗 HLA-II 抗体が C-2(MT-2)ウイルスは中和し、C-2(MOLT-4)ウイルスは中和しないことを示している。また、HTLV-I の単クローン中和抗

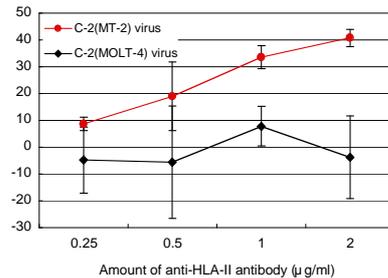


図3 抗 HLA-II 抗体の C-2(MOLT-4)および C-2(MT-2)ウイルスへの中和作用

体である LAT27 は弱いながらも HIV-1 である C-2(MT-2)ウイルスを中和し、非中和抗体である LAT12 は中和作用が認められなかった。

- (4) 抗 HLA-II 抗体の C-2(MT-2)ウイルスエンベロープの流動性抑制作用；抗 HLA-II 抗体、LAT27、LAT12 抗体は、X4 HIV-1 の細胞への吸着には影響を与えなかった。従って、抗 HLA-II 抗体と LAT27 抗体の C-2(MT-2)ウイルスの中和には吸着阻止以外の何らかの作用が働いていると考えられる。そこで、抗 HLA-II 抗体の C-2(MT-2)ウイルスエンベロープの流動性へ与える影響を調べた(図4)。抗 HLA-II 抗体は C-2(MT-2)のエンベロープ流動性を強く抑制したが、C-2(MOLT-4)ウイルスの流動性は抑えなかった。また、LAT27

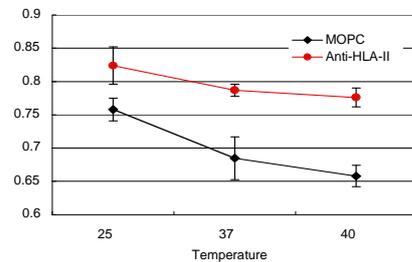


図4 抗 HLA-II 抗体の C-2(MT-2)ウイルスエンベロープ流動性抑制

も LAT12 もウイルスエンベロープ流動性抑制は認められなかったが、MT-2 細胞膜の流動性は LAT27 のみ抑制した。以上、HIV-1 非特異的分子を認識する抗体では、その分子がウイルス表面に充分量存在すれば、抗体はウイルスを中和する。また、その主な中和機序

としては、抗体がエンベロープに附着することによりエンベロープ流動性を抑制することだと考えられた。

- (5) 研究成果のまとめ；ウイルス特異的分子を認識する抗体では、中和抗体と非中和(感作)抗体が存在した。Anti-V3 を主とする中和抗体は同時に PAN 活性も認められた。これらの中和機序は吸着阻止に加えて、エンベロープの流動性を抑制するためだと思われた。一方、抗 HLA-III 抗体に代表される HIV-1 非特異的抗体は、HLA-III 分子が HIV-1 表面に存在すれば、そのウイルスを中和した。この抗体は HIV-1 の吸着は阻止せず、その中和機序はウイルスエンベロープの流動性の抑制だけであると考えられる。中和抗体によるウイルスの中和機序として、ウイルスエンベロープの流動性の抑制があることを初めて証明した。この考え方は、ウイルス非特異的な抗体でも中和可能であるという所見とともに、今後のウイルスに対するワクチン戦略を考える上で重要なものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S. and Koito, A.: The anti-retroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. *Nucleic Acids Res.*, 36: 6859-6871, 2008. 査読有

Maeda, Y., Yusa, K. and Harada, S.: Altered sensitivity of an R5X4 HIV-1 strain 89.6 to coreceptor inhibitors by a single amino acid substitution in the V3 region of gp120. *Antiviral Res.*, 77: 128-135, 2008. 査読有

Harada, S., Monde, K., Tanaka, Y., Kimura, T., Maeda, Y. and Yusa, K.: Neutralizing antibodies decrease the envelope fluidity of HIV-1. *Virology*, 370: 142-150, 2008. 査読有

Monde, K., Maeda, Y., Tanaka, Y., Harada, S. and Yusa, K.: Gp120 V3-dependent

impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J. Biol. Chem.*, 282: 36923-36932, 2007. 査読有

Harada, S., Yokomizo, K., Monde, K., Maeda, Y. and Yusa, K.: A broad antiviral neutral glycolipid, fattiviracin FV-8, is a membrane fluidity modulator. *Cell. Microbiol.*, 9: 196-203, 2007. 査読有

[学会発表](計4件)

遊佐敬介、門出和精、前田洋助、原田信志； HIV-1 感染後 CD4+T 細胞上の CCR5 は down modulation されない、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26 日、大阪国際交流センター

池田輝政、原田信志、小糸厚；小動物由来 APOBEC1 によるレトロウイルス複製阻害の解析、第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26 日、大阪国際交流センター

前田洋助、遊佐敬介、原田信志；ヒト細胞株の HIV-1 感受性の解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 27 日、岡山コンベンションセンター

遊佐敬介、門出和精、前田洋助、原田信志； PM1 細胞では複製能は低い CCR5 発現量に依存して複製能が亢進する V3 loop 変異 HIV-1 の分離、第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 22 日、札幌コンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/biodef/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 信志 (HARADA SHINJI)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：60173085

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし