

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591295
 研究課題名（和文）中和単クローン抗体パネルを用いた AIDS ワクチン開発
 研究課題名（英文）Development of vaccine against HIV/AIDS using a panel of neutralizing monoclonal antibodies.

研究代表者
 松下 修三（MATSUSHITA SHUZO）
 熊本大学・エイズ学研究センター・教授
 研究者番号：00199788

研究成果の概要（和文）：

我々は中和抗体パネルを作成し、HIV-1 に対する中和抗体誘導を検討した。抗体のパネルの中に、gp120 の構造を変化させ、他の抗体の中和能を著しく増強する抗体（0.5 δ ）を見出した。gp120-0.5 δ 複合体をウサギに免疫し、SF162 に対する強力な中和能を誘導できたが、臨床分離株の交差中和能は十分ではなかった。交差中和抗体は立体構造エピトープを認識し、その誘導のためには B 細胞への抗原提示の基礎研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

We investigated induction of neutralizing antibody response against HIV-1 using a panel of neutralizing monoclonal antibodies. Among the panel we identified an antibody (0.5d) that could alter envelope trimer conformation to enhance the neutralizing activity of the other antibodies. We induced high titer neutralizing antibodies against SF162 by immunizing rabbits with a gp120-0.5d complex. However, the anti-sera did not show significant cross-neutralizing activities to the panel of HIV-1 primary isolates. Basic research on antigen presentation to B cell is crucial to obtain such a broad response because a cross-neutralizing antibody recognizes a conformational epitope.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学、感染症、中和抗体、免疫学、ウイルス、内科

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 の世界的な拡大を阻止するワクチンの開発には、多くの期待が寄せられている。本研究は、真に有効な“AIDS ワクチン”の開発に向けた基礎研究である。これまで様々なワクチン候補が作製されたが、効果が確認されたものはない。その理由の一つは、ウイルスの感染を中和する「中和抗体」の誘導が困難

である点あげられる。中和抗体の主な標的は、エンベロープ蛋白（gp120）であるが、その多様性と構造的な柔軟性が、抗体の誘導を困難にしていると考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々がこれまで作成した中和単クローン抗体パネルを用いることで、そ

の問題点を明確にし、解決のための方法を示すことである。さらに、研究がほとんど進んでいない非サブタイプ B ウイルスに対する新たな中和単クローン抗体パネルを作成し、ワクチン開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 交叉中和抗体をもつ HIV 感染症例の選定；サブタイプ B ばかりでなくサブタイプ C, AE などを含む、広範なウイルス株に対して、中和活性を持つ感染症例を特定する。これらの症例より得られた血清中の中和抗体に関して、米国 NIAID の AIDS 研究標準試薬プログラム (ARRRP) から提供を受けたサブタイプ B およびサブタイプ C のパネルウイルスなどを用いて、交叉中和能の高い症例を選定する。
- (2) 中和単クローン抗体の作製；末梢血単核球を分離し、CD8+細胞除去後に EBV を用いてトランスフォームする。gp120 に対する結合活性は抗 gp120-C5 抗体を用いた gp120 capture assay、およびサブタイプ B または C のコンセンサス V3 配列を持つ合成ペプチドを用いた ELISA にて行う。安定した抗体産生細胞が得られたら、これを大量培養し、培養上清中の単クローン抗体をプロテイン A カラムなどで精製する。
- (3) 中和抗体パネルを用いた、gp120 の構造変化の検討およびワクチン候補の選定；どのような条件で、エンベロープ 3 量体が、構造変化を起こすのか、中和エピトープが露出するのかについて、gp120 capture assay および FACS を用いた感染細胞表面への結合試験を用いて解析する。さらに、抗体や NBD 誘導体と gp120 複合体の至適条件を見出して、ウサギなどの小動物に中和抗体の誘導を試みる。誘導された抗体に関しては、臨床分離株を含めた各種ウイルスに対する中和抗体価と交差中和活性を検討する。また、3 量体を形成するように作られた gp140 の蛋白発現系を確立し、エンベロープ 3 量体レベルでの立体構造変化を検討し、ワクチン候補として検討する。

4. 研究成果

我々は中和抗体パネルを作成し、中和抗体誘導の標的を検討してきた。昨年までに開発した抗体パネルの中に gp120 の構造を変化させ、別の中和単クローン抗体の中和感受性を著しく増強する抗体 0.5 δ を見出し、gp120 と 0.5 δ の複合体をウサギに免疫し、SF162 に対する強力な中和抗体が誘導されることを見出した。しかし、米国 NIAID の AIDS 研究標準試薬プログラム (ARRRP) から提供を受けたサブタイプ B および C の臨床分離株への交差中和能は十分得られなかった。我々

はまた、gp120 の立体構造を変化させて、中和抗体の感受性を増強させる NDB556 誘導体を用いて中和エピトープが露出するために至適と考えられる条件で免疫したが、交差中和能を誘導できなかった。新たに作成した抗体パネルの中に、gp120 が CD4 と結合後に露出するエピトープである CD4i に対する複数の抗体を同定し、そのうちの 2 種類にサブタイプを超える交差反応性と中和活性を認めた。反応するエピトープは、ケモカインレセプター結合部位に相当する部分と考えられ、エンベロープ蛋白の保存された領域と考えられるが、立体構造エピトープであるために、人工的な抗原でこれを誘導するのは困難と考えられる。最近、HIV 感染症例より分離された交差反応性の抗体の多くは立体構造エピトープを認識するものであり、これまで行われてきたような免疫の方法では、誘導困難である可能性がある。エピトープの同定に加えて、能動免疫した場合の抗原提示と感染者の体内での B 細胞への抗原提示がどのように異なるのか、どのようにして交差反応性の抗体が誘導されるのかという基礎研究が必要である。

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 6 件)

- 1) Honda, M., Ishisaka, M., Ishizuka, N., Kimura, S., Oka, S. and behalf of Japanese Anti-HIV-1 QD Therapy Study Group. Open-Label Randomized Multicenter Selection Study of Once Daily Antiretroviral Treatment Regimen Comparing Ritonavir-Boosted Atazanavir to Efavirenz with Fixed-Dose Abacavir and Lamivudine. Intern Med 50: 699-705, 2011. (査読有り)
- 2) Narumi, T., Arai, H., Yoshimura, K., Harada, S., Nomura, W., Matsushita, S., Tamamura, H. Small molecular CD4 mimics as HIV entry inhibitors. Bioorg Med Chem, 19: 6735-6742, 2011. (査読有り)
- 3) Narumi, T., Ochiai, C., Yoshimura, K., Harada, S., Tanaka, T., Nomura, W., Arai, H., Ozaki, T., Ohashi, N., Matsushita, S., Tamamura, H. :CD4mimics targeting the HIV entry mechanism and their hybrid molecules with a CXCR4 antagonist. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 5853- 5858, 2010. (査読有り)
- 4) Yamada, Y., Ochiai, C., Yoshimura, K.,

- Tanaka, T., Ohashi, N., Narumi T., Nomura, W., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H. CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 354-358, 2010. (査読有)
- 5) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Kawanami, Y., Shibata, J., Matsushita S. HIV-1 evasion of a neutralizing anti-V3 antibody involves acquisition of a potential glycosylation site in V2. *J. Gen. Virol.* 91: 1335-1345, 2010. (査読有)
- 6) Yoshimura, K., Harada, S., Shibata, J., Hatada, M., Yamada, Y., Ochiai, C., Tamamura, H., Matsushita, S. :Enhanced exposure of human immunodeficiency virus type 1 primary isolate neutralization epitopes through binding of CD4 mimetic compounds. *J. Virol.* 84:7558-7568, 2010. (査読有)
- [学会発表] (計 31 件)
- 1) Ramirez, K., Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K., Tamamura, H., Matsushita, S. : Cross- reactivity and cross-neutralizing activity of monoclonal antibody (MAbs) to CD4-induced epitope of gp120 against HIV-1B, C, CRF_01 subtype viruses. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011. 11. 30. ハイアットリージェンシー東京. 東京都.
- 2) 丸田泰広、桑田岳夫、クリステル. パオラ. ラミレス、バルデス、松下修三 : HIV-1 の V3 領域に結合する中和抗体の遺伝子組換えによる小型化の試み. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2011. 11. 30. ハイアットリージェンシー東京. 東京都.
- 3) Maruta, S., Ramirez, K., Kuwata, T., Matsushita, S. : Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011. 10. 20. Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 4) Ramirez, K., Maruta, Y., Kuwata, T., Yoshimura, K., Tamamura, H., Matsushita, S. : Novel CD4-induced monoclonal antibodies (MAbs) with cross-neutralizing activity against primary isolates of HIV-1 B and C subtypes. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011. 10. 20. Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 5) Kuwata, T., Takaki, K., Matsushita, S. : Biased induction of neutralizing antibodies with particular specificity and gene usage in SIVsmH635FC-infected macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011. 10. 20, Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 6) Yoshimura, K., Harada, S., Hamaji, A., Matsushita, S. Two-step escape pathway of the HIV-1 primary isolates induced by the in vitro selection of maraviroc. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011. 10. 20. Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 7) Harada, S., Ishikawa, T., Hamaji, A., Matsushita, S., Yoshimura, K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 12th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, 2011. 10. 20, Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 8) Kuwata, T., Igarashi, T., Matsushita, S. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies against V3 loop from SIV-infected macaques. AIDS Vaccine 2011, 2011. 9. 12. Bankok Convention Center, Bangkok, Thailand.
- 9) Yoshimura, K., Harada, S., Hamaji, A., Matsushita, S. Maraviroc-resistant subtype B primary HIV-1 induced in vitro selection became highly sensitive to anti-gp120 neutralizing antibodies and autologous plasma IgG under high concentrations of the CCR5 inhibitor. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 2011. 7. 19. The Auditorium Parco della Musica, Roma, Italy.
- 10) Harada, S., Ishikawa, T., Hamaji, A., Matsushita S., Yoshimura K. Impact of raltegravir pressure on the selection of HIV-1 envelope sequences in vitro. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2011. 7. 19. The Auditorium Parco della Musica, Roma, Italy.
- 11) 松下修三 : HIV 陽性者のメンタルヘルスへのアプローチ その 2 メンタルヘルス問題の「今」を考える : どのように捉え、どうアプローチすることが可能だろうか? ~うつと依存症(薬物)を中心に。第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010. 11. 26. グランドプリンスホテル高輪 ザ・プリンス. 東京都.

- 12) 松下修三：共催シンポジウム2 最新の情報を明日の臨床に生かす-Year in review 2010-「病態の研究と治療薬開発の未来」. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.25. グランドプリンスホテル高輪 ザ・プリンス. 東京都.
- 13) 吉村和久、原田恵嘉、濱治有希、松下修三：CCR5阻害剤 maraviroc (MVC) 耐性誘導による Env の変異が中和抗体感受性に及ぼす影響. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24. グランドプリンスホテル高輪 ザ・プリンス. 東京都.
- 14) 原田恵嘉、濱治有希、松下修三、吉村和久：ラルテグラビルは HIV-1 の in vitro 馴化における Env 選択に影響する. 第24回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010.11.24. グランドプリンスホテル高輪 ザ・プリンス. 東京都.
- 15) Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: Strategy to overcome neutralization of HIV-1 primary isolates. 11th GCOE joint international Symposium Kumamoto AIDS Seminar, Oct. 6, 2010. Hotel Nikko Kumamoto, Kumamoto.
- 16) Liu, M., Shibata, J., Harada, S., Takehisa, J., Yoshimura, K., Matsushita, S.: Impact of a point mutation V2 (L175P) in neutralization resistance mediated by functional trimer formation of Env. AIDS Vaccine 2010, Sep. 28, 2010. The Omni Hotel at CNN Center, Atlanta, USA.
- 17) Matsushita, S., Mouri, S., Harada, S., Yamada, Y., Tamamura, H., Yoshimura, K.: CD4 mimetic compound-mediated enhancement of the neutralization activities of anti-V3 and CD4i monoclonal antibodies against the standard panel of primary isolates. XVIII International AIDS Conference. July. 18, 2010. The Reed Messe Wien, Vienna, Austria.
- 18) 松下修三：エンベロープの進化と中和抗体. シンポジウム HIV 細胞侵入とその防御機構. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26-28. 名古屋国際会議場. 愛知県名古屋市.
- 19) 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三：最近分離した7種の臨床 HIV-1 株を用いた in vitro ラルテグラビル耐性ウイルス誘導. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26. 名古屋国際会議場. 愛知県名古屋市.
- 20) 石川哲也, 畑田万紀子, 原田 恵嘉, 吉村和久, 松下修三：実験室 HIV-1 R5 株を用いた in vitro CCR5 阻害薬 (maraviroc) 耐性ウイルス誘導の試み第23回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009.11.26. 名古屋国際会議場. 愛知県名古屋市.
- 21) 畑田万紀子, 吉村和久, 原田恵嘉, 松下修三：抗 HIV-1V3 抗体からの逃避過程で挿入される V2 領域の糖鎖が保存されるメカニズム-HIV-1 の進化における耐性度と増殖能のバランスに関する考察- 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009.10.26. 都市センターホテル. 東京都.
- 22) Narahara, C., Hatada, M., Harada, S., Yoshimura, K., Matsushita, S.: A primary R5 isolate undergoes different escape pathway during in vitro selection with low or high concentration of an anti-V3 monoclonal antibody. AIDS Vaccine 2009, 2009.10.20. The Marriott Rive Gauche Conference Center Paris, France.
- 23) Yoshimura, K., Matsushita, S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium-Satellite Symposium. 2009.9.30, Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto.
- 24) Matsushita, S.: Accumulation of multiple functional mutations in HIV-1 gp120 is involved in the development of neutralization escape under pressure of neutralizing antibody in vitro. Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium-Satellite Symposium, 2009.9.30, Aso Resort Granvilio Hotel. Aso, Kumamoto. Aso, Kumamoto.
- 25) Matsushita, S., Narahara, C., Nishida, Y., Honda, A., Harada, S., Yoshimura, K.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.29, Hotel Nikko Kumamoto, Kumamoto.
- 26) Harada, S., Yoshimura, K., Matsushita, S.: Generation of an integrase inhibitor raltegravir resistant variants using recent primary isolates, X4, R5 and dual/mix HIV-1. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.29, Hotel Nikko Kumamoto, Kumamoto.
- 27) Yoshimura, K., Harada, S., Hatada, M.,

- Matsushita, S.: In vitro induction of HIV-1 resistant to a CCR5 antagonist maraviroc. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28. Hotel Nikko Kumamoto, Kumamoto.
- 28) Ishikawa, T., Yoshimura, K., Hatada, M., Harada, S., Matsushita, S.: Mutations in gp120 of R5 HIV-1 laboratory isolate induced by the in vitro selection of maraviroc confer highly sensitive to anti-V3 monoclonal antibody. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28. Hotel Nikko Kumamoto, Kumamoto.
- 29) Hatada, M., Yoshimura, K., Harada, S., Matsushita, S.: Mechanism of maintaining a glycan-insertion in HIV-1 gp120 V2 region under pressure of a potent neutralizing antibody in vitro. 10th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium. 2009.9.28. Hotel Nikko Kumamoto. Kumamoto.
- 30) Matsushita, S., Narahara, C., Morizono, M., Nishida, Y., Honda-Shibata, A., Harada, S., Yoshimura, K.: Polyclonal antibody response against gp120 including antibodies to V3, CD4bs and CD4i epitopes account for broad neutralization. 5th Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2009.7.20. Cape Town Convension Center, Cape Town, South Africa.
- 31) 松下修三: HIV-1 に対する中和単クローン抗体の治療応用に向けた基礎研究. 第9回日本蛋白質化学学会 2009.5.20. 熊本全日空ホテルニュースカイ. 熊本市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 修三 (MATSUSHITA SHUZO)
熊本大学・エイズ学研究センター・教授
研究者番号: 00199788

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし