

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25年 5月 9日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500387

研究課題名（和文） エイズ発症過程で誘導される自己抗体の解析

研究課題名（英文） Analysis of autoantibodies induced during progression to AIDS

研究代表者

桑田 岳夫（KUWATA TAKEO）

熊本大学・エイズ学研究センター・助教

研究者番号：70346063

研究成果の概要（和文）： HIV 感染に特徴的な CD4⁺ T 細胞の減少における自己抗体の役割をあきらかにするため、HIV 感染の動物モデルである SIV 感染サルで誘導された SIV や自己抗原に対する抗体をファージ・ディスプレイ法によって多数分離した。これらの抗体の解析から、SIV 感染サルにおける自己抗体の誘導が SIV との交叉反応によるものではないことを示し、また、自己抗体の直接的な細胞障害活性が非常に低いことを示唆した。

研究成果の概要（英文）： The role of autoantibodies in CD4⁺ T cell depletion during HIV infection remains unclear. In this study, many antibodies against SIV and self antigens were isolated by phage display method. Analysis of these antibodies revealed that the induction of autoantibodies was not due to the cross-reactivity to SIV and suggested a low cytotoxic activity of autoantibodies in SIV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 実験動物学

科研費の分科・細目： ウイルス・感染症・免疫学

キーワード： HIV・SIV・アカゲザル・エイズ・モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染の世界的な流行や感染者の AIDS 発症を防ぐためには、ワクチンや治療のための新しいアイデアが必要であった。このためには、HIV 感染や AIDS 発症のメカニズムを解明し、ワクチンや治療の新たなターゲットを見つけることが重要になっている。研究代表者は、以下の4つの理由から、「自己免疫疾患のメカニズム」が進行性 CD4⁺ T 細胞減少に重要な役割を果たしていると考えた。

(1) 進行性の CD4⁺ T 細胞減少が AIDS 発症の

最も重要な指標である

(2) 感染初期におけるメモリー CD4⁺ T 細胞の消失は HIV 感染による結果であるが、慢性期のナイーブ・サブセット減少のメカニズムは不明なままである。

(3) 研究代表者らは、進行性の CD4⁺ T 細胞減少にはナイーブ・サブセットの枯渇が重要であることを HIV に近縁な SIV に感染したサルを用いて示した（Kuwata *et al.* 2007, Kuwata *et al.* 2009）。

(4) SIV 感染サルでは、CD4⁺ T 細胞に対する自

己抗体の上昇がナイーブCD4⁺ T細胞枯渇と相関していた(Kuwata *et al.* 2009)。

2. 研究の目的

「自己免疫疾患のメカニズム」が進行性CD4⁺ T細胞減少に重要な役割を果たしていることが示唆された(Kuwata *et al.* 2009)ことから、本研究では、SIV感染サルで誘導されるSIVや自己抗原に対する抗体の解析を行うことによって、AIDS発症における「自己免疫疾患のメカニズム」を検証することとした。この研究で得られた知見によって、より安全なワクチンや治療薬の開発への応用を期待した。

3. 研究の方法

SIV感染サルから抗体遺伝子を増幅し、抗体のFabを発現するファージ・ライブラリを作製した。ライブラリから、SIVやリン脂質、dsDNA等の自己抗原に結合するFabをバイオパンニングによって選別し、これらに特異的なモノクローナル抗体を得た。また、代表的な抗SIV Fabについては、完全抗体のIgGへの変換も行った。これらの抗体の特異性をSIVやリン脂質、dsDNA等の自己抗原ELISAを用いて解析し、その特異性と交叉性をあきらかにした。抗体の細胞障害活性は、細胞から放出される乳酸脱水素酵素(LDH)の測定や、蛍光標識した標的細胞のフローサイトメーターによる検出によって解析した。

4. 研究成果

(1) ファージ・ディスプレイ法によるアカゲザルからの抗体分離系の確立

アカゲザルからファージ・ディスプレイ法によってモノクローナル抗体を分離するため、アカゲザルの抗体遺伝子のシーケンス解析とデータベース上のアカゲザル抗体遺伝子のデータを基に新たなプライマーを作製した。複数のアカゲザルのcDNAを鋳型としたPCRの結果、新たに作製したプライマーがアカゲザルの抗体遺伝子を効率よく増幅することが示された。また、SIV抗原を用いたパンニングの結果、SIVのgp120, gp41, p27に対する多数のモノクローナル抗体を得た。シーケンス解析の結果、得られた抗体は遺伝的にも多様であり、アカゲザル用に改変して構築したファージ・ライブラリが、十分な多様性を持っていることが示された。これらの結果から、アカゲザルからファージ・ディスプレイ法によって様々な抗体を分離できることが示された。

(2) 自己抗原に結合する抗体の分離

SIV感染サルで上昇が認められていたリン脂質、dsDNAに対する自己抗体を分離するため、リン脂質、dsDNAを吸着させたELISAプレートを用い、SIV感染サルから作製した抗体発現ファージ・ライブラリから、リン脂質、dsDNA

に結合する抗体を選び出した。遺伝子解析の結果、使用されている抗体遺伝子やCDRH3の長さなどの特徴が、抗SIV抗体とは異なっており、両者が遺伝的に異なる起源をもっていることが示された。これらの結果は、SIV感染サルにおける自己抗体の誘導が、SIVとの交叉反応によるものではないことを示唆している。

(3) Fabから完全抗体IgGへの変換

抗SIV中和抗体、B404を完全抗体分子へ変換するため、アカゲザルのIgG1重鎖遺伝子全長をPCRで増幅し、哺乳細胞用の発現ベクターに組み込んで、B404重鎖可変部位を挿入した。同様に、B404軽鎖遺伝子を哺乳細胞用の発現プラスミドに組み込み、これらの2つのプラスミドを293A細胞へ遺伝子導入して、完全な抗体分子を産生する細胞株を樹立した。産生されたIgG-B404は、Fab-B404と同等か、それ以上の結合活性と中和活性を示した。

(4) 自己抗体の細胞障害活性の解析

SIV感染サル血漿、及び、リン脂質、dsDNAに結合する自己抗体を細胞に加えて培養しても、LDH測定やフローサイトメーターによる解析では、細胞障害活性がほとんど認められなかった。この結果はSIV感染サルにおける自己抗体の誘導が直接的には細胞障害性と関連していないことを示唆している。CD4⁺ T細胞減少における自己抗体の役割をあきらかにするためには、自己抗体の細胞増殖への影響や他の細胞を経由した間接的なメカニズム等の検討が必要である。

(6) HIV-1感染患者からの自己抗体分離

HIV-1感染患者の末梢血リンパ球にEBVを感染させ、多数の抗体産生B細胞株を樹立した。これらの細胞株から産生された抗体の正常細胞、及びHIV-1 Env発現細胞への反応性を調べ、Env特異的抗体や自己抗体を産生する細胞株を選択した。その結果、正常細胞への反応性が異なる多数の自己抗体産生B細胞株と、少数のEnv特異的IgG産生B細胞株が得られた。多数の自己抗体産生細胞は、HIV-1感染患者における自己抗体の誘導を改めて示し、今後の自己抗体の解析に有用な材料となると考えられる。

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2件)

① Kuwata T, Takaki K, Yoshimura K, Enomoto I, Wu F, Ourmanov I, Hirsch VM, Yokoyama M, Sato H, Matsushita S. Conformational epitope consisting of the V3 and V4 loops as a target for potent and broad neutralization of simian immunodeficiency viruses. *J Virol.* 2013 May;87(10):5424-36. 査読あり

② Kuwata T, Katsumata Y, Takaki K, Miura T, Igarashi T. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-Infected rhesus macaque by phage display. AIDS Res Hum Retroviruses. 2011 May;27(5):487-500、査読あり

〔学会発表〕(計20件)

- ① 田中和樹、桑田岳夫、丸田泰広、園田貴丈、Kristel Ramirez、松下修三 gp120 の CD4-induced epitope に結合する中和抗体の解析 第26回日本エイズ学会学術集会 2012年11月26日 横浜 慶應義塾大学
- ② 桑田岳夫、吉村和久、松下修三 SIV 感染サルから分離された中和抗体 B404 は V3, V4 ループを含む Env 立体構造を認識する 第26回日本エイズ学会学術集会 2012年11月24日 横浜 慶應義塾大学
- ③ 園田貴丈、Samatchaya Boonchawalit、田中和樹、丸田康広、Kristel Ramirez、桑田岳夫、松下修三 CRF01_AE HIV-1 感染症例 IgG の交差中和活性の解析 第26回日本エイズ学会学術集会 2012年11月24日 横浜 慶應義塾大学
- ④ Takeo Kuwata, Kaori Takaki, Ikumi Enomoto and Shuzo Matsushita. Conformational epitope involving V3 and V4 loops is a major target for antibody-mediated neutralization in SIVsmH635-infected macaques. 13th Kumamoto AIDS Seminar. October 26, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑤ Shuzo Matsushita, Kristel Ramirez, Yasuhiro Maruta, Shigeyoshi Harada, Toshihiro Maeda, Toshio Murakami, Takeo Kuwata and Kazuhisa Yoshimura. CCR5-inhibitor resistance confers neutralization sensitive phenotype to primary HIV-1 isolates: Implications for the passive immunotherapy of neutralizing antibodies with CCR5 inhibitors. 13th Kumamoto AIDS Seminar. October 25, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑥ Yasuhiro Maruta, Kristel Ramirez, Yoshiaki Suwa, Hiroshi Morioka, Takeo Kuwata and Shuzo Matsushita. Single-chain variable fragment (scFv) of anti-V3 monoclonal antibody efficiently neutralizes HIV-1 in vitro. 13th Kumamoto AIDS Seminar. October 25, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑦ Kazuki Tanaka, Takeo Kuwata, Yasuhiro Maruta, Takahiro Sonoda, Kristel Ramirez and Shuzo Matshushita. Analysis of Antibodies to CD4-induced epitope on gp120.

13th Kumamoto AIDS Seminar. October 25, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル

- ⑧ Kristel Ramirez, Takeo Kuwata, Yasuhiro Maruta, Kazuki Tanaka, Takahiro Sonoda, Yoko Kawanami, Kaori Takaki, Ikumi Enomoto and Shuzo Matshushita. Efficient isolation of monoclonal antibodies against HIV-1 from HIV-1 infected patients. 13th Kumamoto AIDS Seminar. October 25, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑨ Takahiro Sonoda, Samatchaya Boonchawalit, Hiroyuki Gatanaga, Kazuki Tanaka, Yasuhiro Maruta, Kristel Ramirez, Takeo Kuwata and Shuzo Matsushita. Cross-subtype neutralizing activity of plasma antibodies from patients infected with HIV-1 CRF01_AE. 13th Kumamoto AIDS Seminar. October 19-21, 2012. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑩ Yasuhiro Maruta, Kristel Ramirez, Takeo Kuwata and Shuzo Matsushita. Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. AIDS Vaccine 2012. September 11, 2012. Boston, USA
- ⑪ 桑田岳夫、田中和樹、Kristel Ramirez、丸田泰広、園田貴丈、松下修三 HIV-1/SIV 感染における特定の遺伝子に偏った中和抗体の誘導 第14回白馬シンポジウム 2012年6月8日 京都市国際交流会館
- ⑫ Kristel Paola Ramirez, Takeo Kuwata, Kazuhisa Yoshimura, Yoko Kawanami, Ikumi Enomoto, Shuzo Matsushita. Isolation of two novel CD4-induced monoclonal antibodies (MAbs) with cross-neutralizing activity against viruses of HIV-1 B and non-B subtypes. Keystone Symposium (HIV Vaccines). March 22, 2012. Keystone, USA
- ⑬ 桑田岳夫、松下修三 SIVsmH635FC 感染サルにおける特定のエピトープと遺伝子に偏った中和抗体の誘導 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年12月2日 ハイアットリージェンシー東京
- ⑭ Takeo Kuwata. Biased induction of neutralizing antibodies with particular specificity and gene usage in SIVsmH635FC-infected macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar. October 21, 2011. Kumamoto 阿蘇リゾート グランヴィリオホテル
- ⑮ Yasuhiro Maruta, Kristel Ramirez, Takeo Kuwata and Shuzo Matsushita. Construction of neutralizing antibody fragments for efficient access to V3 epitope. 12th Kumamoto AIDS Seminar.

October 20, 2011. Kumamoto 阿蘇リゾート
グランヴィリオホテル

⑯ Takeo Kuwata, Tatsuhiko Igarashi and
Shuzo Matsushita. Isolation of potent
neutralizing monoclonal antibodies
against V3 loop from SIV-infected macaques.
AIDS Vaccine 2011. September 12, 2011.
Bangkok, Thailand

⑰ 桑田岳夫 特定のエピトープと遺伝子に
偏った中和抗体の誘導 第13回白馬シン
ポジウム 2011年5月20日 札幌 北海道
大学

⑱ 桑田岳夫 ファーシ・ディスプレイ法に
よる強力な抗SIV中和活性をもつモノクロー
ナル抗体の作製 第58回日本ウイルス学会
学術集会 2010年11月9日 徳島あわぎん
ホール

⑲ Takeo Kuwata. Generation of monoclonal
antibodies with potent neutralizing
activity from a SIV-infected macaque. The
28th Annual Symposium for Nonhuman Primate
Models for AIDS. October 19, 2010. New
Orleans, USA

⑳ Takeo Kuwata. Isolation of monoclonal
neutralizing antibodies from SIV-infected
macaques by phage display. 11th Kumamoto
AIDS Seminar. October 7, 2010. Kumamoto
阿蘇リゾート グランヴィリオホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 岳夫 (KUWATA TAKEO)
熊本大学・エイズ学研究センター・助教
研究者番号：70346063

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

五十嵐 樹彦 (IGARASHI TATSUHIKO)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：90467431