

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010 年度

課題番号：21890196

研究課題名（和文）HIV の新規感染阻止エピトープの探索と感染阻止抗体の開発

研究課題名（英文）Examination of novel epitopes and development of inhibitory antibodies for the effective inhibition of HIV infection

研究代表者

戸田 哲平 (TODA TEPPEI)

熊本大学・エイズ学研究センター・COEリサーチアソシエイト

研究者番号：60551273

研究成果の概要（和文）：

HIV の新規感染阻止エピトープを探索するために、HIV が CD4<sup>+</sup>T 細胞に感染する際に細胞膜上に形成する HIV envelope (env)-CD4-ケモカイン受容体膜融合中間複合体と、可溶性 CD4 を高親和性抗体産生マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製した。抗 CD4 抗体 R275 は CD4 上のドメイン 3 の新規エピトープを認識し HIV-1 の感染を阻止した。膜融合の動的エピトープを認識し、新たな感染阻止の標的を明らかにすることが出来る、抗膜融合複合体抗体ライブラリーを樹立した。

研究成果の概要（英文）：

For the examination of novel epitopes that can effectively inhibit HIV infection, we immunized soluble CD4 and membrane fusion intermediate complex of HIV envelope-CD4-chemokine receptor that is formed on the cell membrane of CD4<sup>+</sup> T cell during the infection of HIV, to the high-affinity antibody (Ab) producing mice. And we established anti-CD4 monoclonal (m) Ab and anti-fusion complex (FC) mAb libraries. Anti-CD4 R275 mAb recognized novel epitope of domain three of CD4 and inhibited HIV-1 infection. We established anti-FC mAb library that recognized dynamic epitopes appearing during the membrane fusion process. Our mAb library may be useful on the examination of novel target of inhibition of HIV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	610,000	183,000	793,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,680,000	504,000	2,184,000

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：感染症、ウイルス、免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

人類史上最悪の疫病とも言われる AIDS の撲滅は依然として世界的な重要課題の一つである。治療薬開発の研究結果の蓄積によって AIDS 発症の抑制が可能となり AIDS は不治の病ではなくなりつつあるが、HIV の慢性持続感染を阻止することは未だ困難で、新たな視点から戦略を考え直す必要がある。アジア・アフリカの発展途上国では継続的な投薬が経済的に困難であり、HIV 感染の撲滅にはワクチンの開発が最も重要な喫緊の課題である。ワクチンを設計する上で重要な点は、産生誘導された抗体がウイルス認識を継続できることである。HIV ウイルス表面に存在し、中和の標的となる HIV env gp120 には頻繁に変異が起り、立体構造が変化し易く通常では安定した抗原認識が難しい。また env は全体的に高度に糖鎖で覆われ、抗体の結合を阻害している (Burton et al., Nat. Immunol., 2004)。このためエイズワクチン開発は暗礁に乗り上げている。LaCasse らは CD4 と CXCR4 又は CCR5 を発現する細胞と HIV env を発現する細胞を共培養し、ウイルス-細胞膜融合が起こる中間状態をホルムアルデヒドで固定し、この複合体を免疫源 (FC-immunogen) としてマウスに投与し、広範囲に中和能を持つ血清を樹立することを発表した (LaCasse et al., Science, 1999)。この論文は世界的に大きな波紋を引き起こしたが、再現性の問題から 2002 年に撤回されている。この論文が示した概念、すなわちウイルスによる膜融合を阻止するエピトープが出現するという可能性は、ワクチン開発に有効な示唆をした。それを実証するかのように、Luftig らは膜融合中間体の HIV env gp41 を認識し中和する D5 というモノクローナル抗体を得ており (Luftig et al., Nat

Struct. Biol., 2006)、FC-immunogen を用いることで新規中和エピトープが発見される可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

このような新しいエピトープの同定は① FC-immunogen の最も有効な調整を行うことができる実験システムを用いること、②このエピトープを強力な結合活性を持って認識するモノクローナル抗体を作製することで達成することが可能になると考えた。

我々は①に関して CD4/CXCR4 を発現する細胞と HIV env を発現する細胞を混合培養して膜融合する瞬間を、GFP のドメインの分割した状態が合体した際に生じる蛍光色素の発色を持って瞬時同定することで検出する実験系を用いた FC-immunogen の調整を行う。

②に関しては数多くの抗原系に対して  $K_D=1 \times 10^{-11} \text{ M}$  という超高親和性のモノクローナル抗体作製することのできる GANP トランスジェニック (GANP<sup>Tg</sup>) マウスを用いてウイルス感染阻止エピトープを特異的に検出する。

我々の研究室では GANP 分子を発現させた GANP<sup>Tg</sup> マウスにおいて nitrophenyl (NP) ハプテン、HIV-1 gp120 V3 エピトープ (Sakaguchi et al., J. Immunol., 2005)、SARS CoV 中和エピトープ、胆管癌特異的糖鎖抗原エピトープ (Unpublished data) に対して  $K_D = 1 \times 10^{-9}$  から  $10^{-11} \text{ M}$  の高親和性モノクローナル抗体の作製に成功している。

また我々は抗原性の安定性の点から宿主 CD4 に着目し、env-CD4-ケモカインレセプター膜融合複合体形成反応の進行を阻止することのできるエピトープの探索を行うこととした。

本研究は上述の手法を用い、HIVワクチンの設計に有用で、抗体が継続して認識できHIV

の感染阻止が可能な、新規エピトープを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

宿主 CD4 の HIV 膜融合阻害エピトープ探索を行う為に可溶化 CD4 リコンビナントタンパク (R&D systems) を免疫源に用い、HIV env-CD4 膜融合複合体のエピトープ探索を行う為に CD4/CXCR4 を発現する細胞と HIV env を発現する細胞を混合培養し、膜融合する瞬間を Green Fluorescence Protein (GFP) のドメインを分割した状態が合体した際に生じる蛍光色素の発色を持って瞬時同定し、Fusion Competent (FC)-immunogen の調整を行った。これらの抗原を GANP トランスジェニックマウスに免疫し、HIV 感染阻止エピトープを特異的に検出する超高親和性のモノクローナル抗体を作製することとした。

HIV の新規エピトープ探索と中和抗体について、我々は国際共同研究で、共同研究者より CD4/細胞膜局在 GFP1-10 発現 293 細胞 (293-CD4/GFP1-10) と HIV-1 HXB2 株由来の HIV env 発現ベクター、細胞膜局在 GFP11 ベクターの供与を受けた。293-CD4/GFP1-10 と遺伝子導入し作製した env/細胞膜局在 GFP11 発現 293 細胞 (293-env/GFP11) を共培養し細胞融合させると、293-CD4/GFP1-10 側の膜局在 GFP1-10 と、293-env/GFP11 側の GFP11 が結合して GFP が蛍光を発するシステムを有している (Wang et al., 2009; 図 1)。

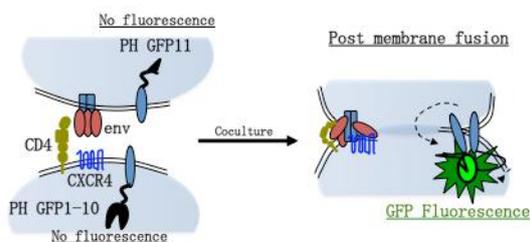


図1. 膜融合発光システム  
(Wang et al., J. Virol. Methods., 2009)

293-CD4/GFP1-10 と 293-env/GFP11 を用い

GFP の発光を基に、LaCasse らの論文 (LaCasse et al, J.Virol. 1998; Science, 1999) に述べられているような FC-immunogen の作製条件を検討し、37°C下 20 分の共培養と至適条件を決定した。FC-immunogen を GANP<sup>Tr</sup>マウスに免疫し、P3U1 ミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを作製した。膜融合複合体、env、CD4 特異的に反応する抗体クローンを 650 に及ぶ抗体ライブラリーから選別するために、FC-immunogen の免疫染色と顕微鏡観察、293、293-CD4、293FT-env、293FT 細胞を用いた FACS 解析を行った。同時に培養上清を用いた NL43 リコンビナント HIV-1 に対する中和能の予備試験を行った。現在、候補クローンを 78 クローンに絞り、モノクローナル抗体を精製し、HIV-1 ウイルス膜融合に及ぼす活性が存在するかどうかの検証を継続している。

抗 CD4 抗体に関しては市販の可溶化 CD4 を GANP<sup>Tr</sup>マウスに免疫しハイブリドーマを作製した。免疫源に対する ELISA と 293-CD4 細胞表面の CD4 に対する反応 FACS によって反応するクローンを選別し、9 クローンの CD4 抗体が得られたため、ドメイン欠損 CD4 リコンビナントタンパクを作製してエピトープの決定を行った。エピトープが決まらなかったものに関しては、立体構造が保たれている細胞表面 CD4 に対する競合結合実験を種々の抗 CD4 抗体を用いて行い、エピトープを決定した。

NL43、JR-FL の env を用いたリコンビナント HIV-1 と TZM-b1 細胞 (CD4<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>) を用いて抗 CD4 抗体の HIV-1 感染阻止能を調べ、膜融合発光システム (図 1) を用いて膜融合阻害能を調べた。9 クローン得られた CD4 抗体の内、CD4 ドメイン 3 に結合する R275 抗体は HIV 感染阻止能を有していた。

#### 4. 研究成果

膜融合中間体特異的抗体ライブラリーを作製し、広範なスクリーニングにより 78 クローンを選別した。そのうち 3 種は中間体のみ出現する動的エピトープに対する抗体であることから、従来知られていない新たな標的を明らかにすることが出来る抗体として確立した。中和活性を検証し、ウイルス感染における各エピトープの出現の時期、その動態、終結に至るプロセスを解析している。LaCasse らの主張するエピトープの存在を証明できるかもしれないと期待している。これらの抗体の認識するエピトープの立体構造と感染阻止機序を明らかにするために、海外の X 線構造解析の専門家と共同研究を開始している。

作製した抗 CD4 抗体 R275 の HIV-1 中和活性が従来の抗 CD4 抗体とは異なり、直接 env との結合を形成しない CD4 分子のドメイン 3 を認識し、その HIV 感染阻害活性は膜融合過程の env-CD4-ケモカインレセプター複合体の立体構造変化を阻害していることを明らかにした。また R275 抗体の認識部位が中和能を持たない OKT4 抗体の認識部位とごく近傍であることから、その感染阻止機序が新たな治療対象となることが示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) T. Toda, K. Kuwahara, N. Kondo, Y. Maeda, A. Irie, Z. Matsuda, N. Sakaguchi. A novel anti-CD4 monoclonal antibody that inhibits HIV-1 membrane fusion. 第 11 回熊本エイズセミナー・グローバル COE 合同国際シンポジウム, 2010 年 10 月 7 日、8 日, 熊本県阿蘇市・阿蘇リゾートグランヴィリオホテル

- 2) T. Toda, K. Kuwahara, N. Kondo, Y. Maeda, A. Irie, Z. Matsuda, N. Sakaguchi. Newly established anti-CD4 antibody affects HIV-1 infection. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology Kobe, Japan, 2010 年 8 月 26 日, 神戸市・神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場

- 3) T. Toda, K. Kuwahara, N. Kondo, Y. Maeda, A. Irie, Z. Matsuda, N. Sakaguchi. Inhibition of HIV-1 infection by novel anti-CD4 monoclonal antibody. Global COE Program International Young Investigator Symposium, 2010 年 3 月 5 日, 熊本市・熊本大学.

- 4) 戸田哲平, 桑原一彦, 前田洋助, 北嶋正大, 阪口薫雄. 高親和性モノクローナル抗体による CD4 エピトープの検討. 第 23 回日本エイズ学会学術集会, 2009 年 11 月 27 日, 名古屋市・名古屋国際会議場.

- 5) T. Toda, K. Kuwahara, Y. Maeda, M. Kitabatake, N. Sakaguchi. Development of new high-affinity monoclonal antibodies against human CD4 that effectively inhibit HIV infection. 第 10 回熊本エイズセミナー・グローバル COE 合同国際シンポジウム, 2009 年 9 月 28 日, 熊本市・ホテル日航熊本.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

戸田 哲平 (TODA TEPPEI)

熊本大学・エイズ学研究センター・COE  
リサーチアソシエイト

研究者番号: 60551273