

令和 4 年 10 月 22 日現在

機関番号：12608
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17K08854
 研究課題名(和文) HIVによるT細胞機能不全の抗ミリストイル基ダイアボディによる治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment with anti-myristoylation diabody for HIV-induced T cell dysfunction

研究代表者
 林 宣宏 (HAYASHI, Nobuhiro)
 東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：80267955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： AIDSの新たなコンセプトに基づく治療法のための、HIV-Nefの機能を制御するダイアボディ(2重特異性抗体)を、抗ミリストイル基抗体と抗HIV-Nef抗体、さらに、細胞に入り込むための分子針も備え付けて作製する。HIV-Nefを導入したT細胞にこのダイアボディを作用させることで、HIV-NefによるT細胞の機能阻害を阻止する。

独自の抗体ライブラリー技術により、抗HIV-Nef抗体と抗ミリストイル基抗体の開発に成功した。また、ファージ由来の分子針を抗HIV-Nef抗体に融合することにも成功した。今回作成した人工抗体がHIVに感染したT細胞の機能を回復させられるかが今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発を目指すAIDS治療薬は、既存薬剤と異なりNefを標的分子とするため、交叉耐性が生じる可能性が低いと考えられる。また、本治療薬は結合部位(エピトープ)をNefの任意の領域とするため、複数の薬剤を開発することができ、薬剤耐性変異獲得に対応しやすいと考えられる。

ミリストイル化はがんや様々な疾患の治療対象になることが、近年、続々と報告されている。本研究で証明するコンセプトは、病原因子(ミリストイル化タンパク質)の分子機能そのものではなく、細胞内局在を制御することによる疾患治療に関するものであり、AIDSに限らず、分子機能が未知の病原因子に関連する疾病治療の新たな戦略になりえるものである。

研究成果の概要(英文)： Diabody (bispecific antibody) that controls the function of HIV-Nef for novel medical treatment of AIDS based on the new concept has been developed by combination of anti-myristoyl group antibody, anti-HIV-Nef antibody, and a molecular needle for entry into cells. By allowing this artificial diabody to act on AIDS infected T cells into which HIV-Nef has been introduced, inhibition of T cell function by HIV-Nef is prevented.

Anti-HIV-Nef antibody and anti-myristoylation group antibody have been succeeded in developing by original antibody library technology. We also succeeded in fusing a phage-derived molecular needle to the anti-HIV-Nef antibody.

The future issue is whether the artificial antibody created this time can restore the function of HIV-infected T cells.

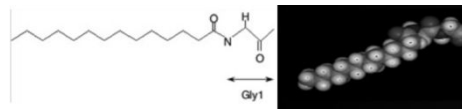
研究分野：分子生物額

キーワード：HIV antibody myristoylation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミリスチル化 (飽和脂肪酸による翻訳後修飾: 右図) タンパク質は細胞膜との可逆的な“弱い”相互作用 (解離定数は 10^{-5} 乗程度) によって、細胞の状態に応じて細胞膜と細胞質を“速やかに”移行すること



で様々な生理機能を担っていることを申請者は明らかにしてきた (*Protein Science* 9: 1905-1913, 2000, *J. Biol. Chem.* 278: 48898-48902, 2003, *J. Mol. Biol.* 338: 169-180, 2004, *Proc., Jpn., Acad., Ser. B*, 86: 494-508, 2010、基盤研究 C (H26-H28))。感染後に発現すると宿主細胞内でミリスチル化される HIV の nef 遺伝子産物 (HIV-Nef) は、生体内にもともと存在する他のミリスチル化タンパク質の働きに介在することで T 細胞の機能を停止し、AIDS が発症すると考えられている (*Protein Science* 11: 529-537, 2002, *Protein Sci.* 14: 494-503, 2005)。遺伝子変異によりミリスチル化されないようになった Nef を有する感染者では AIDS が発症しないことから、Nef の機能にはそのミリスチル基が必須であることが明らかになった。さらに、ミリスチル化タンパク質の多くが細胞膜脂質ラフトにおいて機能することから、Nef も T 細胞のラフトに移行し、そこで感染宿主細胞の機能を停止すると考えられる。近年、Nef の細胞膜への移行により、免疫関連分子である CD4 が細胞膜上から消失する、等の現象が明らかになっているが、その分子機構に関しては未だ不明である。しかし、いずれにせよ、それには Nef の細胞膜への移行が必須なのであり、すなわち、Nef の移行を阻止出来れば、Nef による T 細胞機能の阻害も起こらない。

Nef はミリスチル化タンパク質である。ミリスチル化蛋白質は細胞の状態に応じて細胞膜から離れたり、あるいは、付け加わったりすることで細胞膜上の機能性マイクロドメインである細胞膜脂質ラフトの機能変換を担っているが、迅速かつ柔軟にラフトが機能するためには、ミリスチル化蛋白質が状況に応じてすんなりとラフトから離れなければならない。それを可能としているのは、ミリスチル基と膜との弱い相互作用である。Nef のミリスチル化が AIDS の発症に必須であるということは、T 細胞を殺すこと無くその機能だけを停止するには、この弱い相互作用が必須であることを強く示唆している。そこで申請者は、弱い相互作用を調べるために有効なタンパク質の部位特異的標識法を開発した。これまで、細胞内の分子の挙動に関する研究は数多く行われてきたが、その際、分子の位置を可視化するプローブの付与が不可欠となる。その代表的なものは GFP であるが、その分子量は 27k もあり (HIV-Nef の分子量も約 27k)、また、付与出来る場所も基本的にはタンパク質の両端に限られていた。この場合、膜貫通ドメインを有し、膜に埋没して遊離しないような膜タンパク質の挙動を調べる場合は有効だが、ミリスチル化タンパク質の場合には膜との相互作用が弱いので、GFP を融合させると分子量が大きくなって、膜に局在する能力を失ってしまう。そこで申請者は、変異体アミノアシル tRNA 合成酵素を用いて非天然アミノ酸であるアジドチロシンでアミノアシル化したサプレッサー tRNA を使い、ストップコドンを導入した任意の位置にアジドチロシンを導入し、そのアジドチロシンを介して任意のプローブをタンパク質に導入できる技術を開発した (*J. Biochem.* 141: 335-343, 2007, *J. Biochem.*, 153, 317-326, 2013)。この手法により、追跡対象分子の生理機能に影響を与えない部位に、その動きを阻害しない軽くて小さなプローブ (蛍光素子) を導入できる。

他方、申請者は、細胞内の全タンパク質の 1% 弱がミリスチル化されていることも明らかにした (*Genome Biology* 5: Article R21, 2004, ミリスチル化予測ツール MYRbase (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/myrbase/>))。この結果をうけて、リン酸化や糖鎖修飾と同様に、各タンパク質のミリスチル化の状態を簡便に調べる方法が求められたが、これまではタンパク質のミリスチル化を検出する簡便な方法は存在しなかった。ミリスチル基は化学的に安定なので化学反応による検出は難しい。次に抗体による検出が考えられるが、ミリスチル基の化学構造は生体膜の構成成分と酷似しているため、通常の動物免疫法ではミリスチル基で免疫しても自己免疫反応を避けるために免疫応答が惹起されず、抗体を得るのも困難であった。そこで、申請者は独自の抗体ライブラリー法 (特願 2007-058458、出願日: 2007 年 3 月 7 日) を用いて、さらに、抗原を工夫することで、抗ミリスチル基抗体の開発に成功した (特願 2013-088891 (出願日: 2013 年 4 月 19 日)、および、特願 2014-052535 (出願日: 2014 年 3 月 14 日))。

HIV はその遺伝子産物である Nef によって、本来は感染宿主細胞 (T 細胞) が使用している弱い相互作用に介在して効果的に細胞機能を停止している。その分子機構を調べるには、既存の蛍光標識法ではミリスチル化タンパク質の生体膜との弱い相互作用を阻害してしまうので観察が出来ないが、上述の部位特異的に任意のプローブで標識する方法を使えば調べることが出来る。また、その相互作用を抑えるには、それに使われているミリスチル基をブロックできる抗ミリスチル化抗体が使える。さらに、細胞内に多数存在するミリスチル化タンパク質の中から HIV-Nef を標的化するには、最近開発したリコンビナント抗 Nef 抗体が有効である。

2．研究の目的

AIDS の新たなコンセプトに基づく治療法のための、HIV-Nef の細胞膜への移行をそのミリス
トイル基をブロックすることで抑えるダイアボディを開発する。

3．研究の方法

HIV-Nef の機能を制御するダイアボディ(2 重特異性抗体)を、抗ミリストイル基抗体と抗 HIV-
Nef 抗体、さらに、細胞標的化のためのサイトカイン、また細胞に入り込むための分子針も備え
付けて作製する。HIV-Nef を導入した T 細胞にこのダイアボディを作用させることで、HIV-Nef
による T 細胞の機能阻害を阻止する。

4．研究成果

組換え体 Nef を調製し、当研究室で作製されたマウス由来抗体ライブラリー(4.5×10^7 clone)
を用いてスクリーニングを行い、十分な特異性と結合力を有する抗 Nef 抗体の取得に成功した。

他方、抗体ライブラリーを用いて、抗ミリストイル基抗体 (clone r119) の開発にも成功
し、これら二つの抗体を、抗体遺伝子が得られるという抗体ライブラリーの特性を活かして、
遺伝子工学的に連結し、ダイアボディを作成した。

本研究では、その過程で、抗原に結合するだけで発光する抗体(Q-body)の開発にも成功した。

本研究で証明するコンセプトは病原因子 (ミリストイル化タンパク質) の分子機能そのもの
ではなく、細胞内局在を制御することによる疾患治療に関するものであり、AIDSに限らず、分
子機能が未知の病原因子が関連する疾病治療の新たな戦略になりえるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kurumida Yoichi, Hayashi Nobuhiro | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Development of a Novel Q-body Using an In Vivo Site-Specific Unnatural Amino Acid Incorporation System | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sensors | 6. 最初と最後の頁 2519 ~ 2519 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s18082519 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 新井淳、渡邊 和哉、林宣宏 |
| 2. 発表標題 AIDS治療のための二重特異性抗体の開発 |
| 3. 学会等名 分子生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|