

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591119

研究課題名（和文） HIV に対する中和抗体誘導型ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of vaccine that induces neutralizing antibodies to HIV-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

研究成果の概要：

HIV-1 感染を阻止する中和抗体の誘導を目的としたワクチン候補の探索が世界的に行われているが、いまだに有効な方法の報告はない。我々は、様々な中和単クローン抗体を用い、その中和能や gp120 への反応性を検討した。その結果、CD4bs 抗体の 0.5 δ が単独で gp120 に立体構造変化を起こし V3 抗体の反応性を飛躍的に増強することを見出した。この結果は gp120 と CD4bs 抗体複合体の免疫源としての可能性を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：ウイルス、感染症、内科、免疫学、HIV、中和抗体、ワクチン開発

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染の世界的拡大を阻止するため、感染阻止ワクチンの必要性はますます大きくなっている。これまで様々なワクチン候補が作製され、その一部は試験管内及び動物モデルでの有効性に基づき、臨床試験も行われてきたが、有効性が確かめられたものはない。HIV 感染から個体を防御する免疫として、細胞性

免疫の重要性が強調されてきたが、最近では液性免疫（中和抗体）の重要性が見直されている。これまでのワクチン候補の中には中和抗体を誘導できたとするものもあるが、ワクチン開発に用いられた中和感受性の高い実験室株は中和するものの臨床分離株には無効であった。このように、感染阻止ワクチンの開発には広範囲のウイルス株に反応しう

る中和抗体の誘導が重要であることが再認識されてきた。

2. 研究の目的

HIV-1 感染を効果的に抑制する中和抗体の誘導を目的としたワクチン候補の探索が世界的に行われているが、いまだに多くの HIV 株に対して中和活性を示す抗体の誘導は報告されていない。そればかりか、どのような中和抗体を誘導すべきかさえいまだ明らかでない。本研究の目的は、HIV ワクチン開発に重要な中和抗体はどのような特異性を持ったものかを探索し、これを誘導する方法を探ることにある。

3. 研究の方法

末梢血 B 細胞に EB ウイルスを感染させ、クローニングを繰り返し、抗 gp120 活性をもつ抗体産生細胞を分離した。これらの単クローン抗体を用いて gp120_{SF2} または gp120_{SF162} に対する結合活性と様々なウイルス株に対する中和活性を調べた。エンベロープ gp120 単量体に対する結合活性の評価には、“gp120-capture ELISA”をもちいた (J.P. Moore et al., J. Virol. 67, p6136-6151, 1993)。抗体が感染に重要な、3 量体構造を形成した機能的エンベロープを認識できるかどうか検討するため HIV-1_{JR-FL} 株慢性感染細胞 (PM1/JR-FL) の細胞表面に対する抗体の結合活性をフローサイトメーターにて調べた。CD4bs 抗体が gp120 に結合後に gp120 に立体構造変化を起こすかどうか、各抗体をビオチン化し gp120-capture ELISA を用いて調べた。gp120_{SF2} および gp120_{SF162} は、大阪大学ウイルス研究所中山英美・塩田達雄先生名から供与していただいた。Gp120 の精製には抗 V3 抗体 KD-247 のアフィニティークロマトグラフィーを用いた。

4. 研究成果

HIV-1 に感染しながら発症しない長期非進行症例の中には、広範囲のウイルス株に対し強力な中和抗体活性を持つ症例がある。今回我々は、このような一人の長期非進行症例から 20 種類の中和単クローン抗体を分離した。V3-peptide に反応する抗 V3 抗体が 6 種類、CD4 結合部位に対する抗体 (CD4bs) が 5 種類、CD4 結合後に露出するエピトープに対する抗体 (CD4i) が 4 種類、どれにも分類されないものが 5 種類であった。これらのうち、実験室株に対して中和活性を示すものについて、臨床分離株やワクチン開発のスタンダードパネルに対する活性を調べた結果、広範囲の分離株に反応する V3 抗体と CD4bs 抗体が相補的に作用することを見出した。

一方、gp120 は CD4 分子と結合後に立体構造変化を起こすことが知られている。我々は、CD4bs 抗体が gp120 に結合後に gp120 に立体構造変化を起こし他の抗体の反応性を変化させる可能性を考えた。前述の gp120-capture ELISA の方法で “gp120-captured plate” を作成し、CD4bs 抗体のひとつである 0.5 δ (3D6) またはコントロールの抗体 (8D11) を 15 分反応させたあと biotin を結合させた抗体、1C10, 3E4, 3D6, 4C11 を各濃度で 2 時間反応させた。ELISA wash buffer で洗浄後 Avidin-ALP を 1 時間反応させ基質を加えて発色させた。さまざまな検討の結果ビオチン化した 0.5 γ や 3E4 の V3 抗体は 0.5 δ 存在下に gp120 に対する反応性が著名に増加した。一方、ビオチン化した 0.5 δ (3D6) や 4C11 の反応性は 0.5 δ 存在下に抑制された。このように、CD4bs 抗体の 0.5 δ は単独で gp120 に立体構造変化を起こし V3 抗体 (特に 0.5 γ) の反応性を飛躍的に増強させることがわかった。3 量体構造を形成した機能的エンベロープを発現する HIV-1_{JR-FL} 株慢性感染細胞

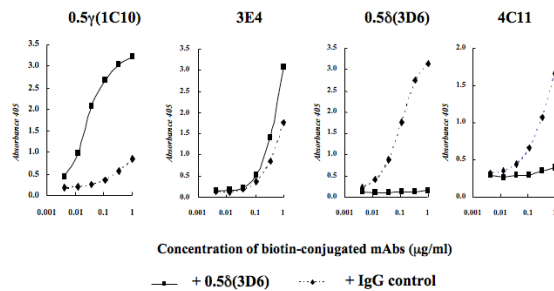


図.0.56 (3D6)によるgp120に対するV3抗体反応性の著名な増強
CD4bs抗体のひとつである0.5δ(3D6)またはコントロール抗体の存在下にビオチン化した単クローン抗体のgp120に対する反応性を検討した。0.5δ(3D6)存在下にV3抗体 (0.5γや3E4) の反応性は著名に増強されたが、CD4bsの0.5δ(3D6)やCD4iの4C11の反応性は0.5δ存在下に抑制された。

(PM1/JR-FL) の細胞表面に対する抗体の結合活性について、同様の実験をフローサイトメーターにて調べた。すると、gp120 単量体と同様に V3 抗体である 0.5γ や 3E4 の反応性は 0.5δ 存在下に著名に増強された。これらの結果から、中和抗体誘導型ワクチンの開発には広範囲の分離株に反応する抗 V3 抗体と CD4bs 抗体の両方の誘導が必要であると考えられた。また、Gp120 と CD4bs 抗体の複合体を用いると gp120 の抗原性の増強が期待できるのではないかと考えられた。免疫実験のためにはある程度まとまった量の精製された gp120 が必要であり、現在作成中である。

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 9 件)

- ① Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Hiromi Soeda, Hattori, S., Perrem, K., Yamamoto, M., Chiba, J., Mimaya, J., Yoshimura, K., Matsushita, S., Honda, M., Yoshimura, A., Sawasaki, T., Aoki, I., Morikawa, Y., Yamamoto, N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:294-299, 2008.
- ② Ikeda, T., Ohsugi, T., Kimura, T., Matsushita, S., Maeda, Y., Harada, S., Koito, A. The anti-retroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species. Nucleic Acids Research, 36(21): 6859-6871, 2008.
- ③ Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K.,

Koito, K., Matsushita, S. Recurrent HIV-1 integration at the BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. J. Infect. Dis. 195:716-725, 2007.

- ④ Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T., Matsushita, S.: Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. J. Virol 81:3757-3768, 2007
- ⑤ Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., Theodorou, I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. Immunogenetics 59:511-515, 2007.
- ⑥ Gatanaga, H., Hayashida, T., Tsuchiya, K., Yoshino, M., Kuwahara, T., Tsukada, H., Fujimoto, K., Sato, I., Ueda, M., Horiba, M., Hamaguchi, M., Yamamoto, M., Takata, N., Kimura, A., Koike, T., Gejyo, F., Matsushita, S., Shirasaka, T., Kimura, S., Oka, S.: Successful efavirenz dose reduction in HIV-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. Clinical Infectious Diseases., 45: 1230-1237, 2007.
- ⑦ Eda, Y., Takizawa, M., Murakami, T., Maeda, H., Kimachi, K., Yonemura, H., Koyanagi, S., Shiosaki, K., Higuchi, H., Makizumi, K., Nakashima, T., Osatomi, K., Tokiyoshi, S., Matsushita, S., Yamamoto, N., Honda, M. Sequential immunization with V3 peptides from primary HIV-1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with matching narrow neutralization sequence motif. J. Virol. 80: 5552-5562, 2006.
- ⑧ Eda, Y., Murakami, T., Ami, Y., Nakasone, T., Takizawa, M., Someya, K., Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Matsushita, S., Higuchi, H., Matsui, H., Shinohara, K., Takeuchi, H., Koyanagi, S., Yamamoto, N., Honda M. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a

heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 80 : 5563-5570, 2006

- ⑨ Yoshimura, K., Shibata, J., Kimura, T., Honda, A., Maeda, Y., Koito, A., Murakami, T., Mitsuya, H., Matsushita, S. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. *AIDS*, 20:2065-2073, 2006.

[学会発表] (計 23 件)

- ① Yoshimura, K., Harada S., Hatada, M., Matsushita, S.: Mutations in V4 and C4 regions of the HIV-1 CRF-BC envelope induced by the in vitro selection of Maraviroc Confer cross-resistance to other CCR5 inhibitors. 16th Conference on Trtroviruses and Opportunistic Infections(CROI 2009). 2009. 2. 8-11, Montreal, Canada.
- ② 吉村和久、原田恵嘉、畑田万紀子、増野弘幸、玉村啓和、松下修三: CD4 mimic small compoundの in vitro 耐性誘導による結合部位の予測. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2008. 11. 26-11. 28. 大阪
- ③ 畑田万紀子、吉村和久、石川哲也、原田恵嘉、松下修三: V2 領域の N-glycosylation site 挿入が抗 V3 中和抗体エスケープに及ぼす影響. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2008. 11. 26-11. 28. 大阪
- ④ 榎原知里、吉村和久、畑田万紀子、原田恵嘉、松下修三: 中和抗体高感受性 R5 臨床分離株の抗 V3 抗体による in vitro 中和逃避ウイルス誘導. 第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2008. 11. 26-11. 28. 大阪
- ⑤ Matsushita, S., Nishida, Y., Shibata J., Honda A., Yoshimura, K: Broad cross-neutralization mediated by combination of anti-V3 and CD4 binding site antibodies in an HIV-1 infected patient with long-term non-progressie disease. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA
- ⑥ Yoshimura, K., Shibata J., Honda, A., Yamada, Y., Nasuo, H., Tamamura, H., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficienby virus type 1

variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound, N-(4- Chlorophenyl) -N' - (2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-4-yl) - oxalamide (NBD-556). 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA.

- ⑦ Yoshimura, K., Hatada, M., Harada, S., Shibata, J., Masuo, H., Tamamura, H., Matsushita, S.: In vitro induction of human immunodeficienby virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- ⑧ Hatada, M., Yoshimura, K, Ishikawa, T., Harada, S., Matsushita, S.: The impact of an N-linked glycosylation site insertion in HIV-1 gp120 region to escape from a potent neutralization anti-V3 monoclonal antibody. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- ⑨ Narahara, C., Yoshimura, K., Hatada, M., Harada, S., Matsushita, S.: Different mutation in HIV-1 gp120 V3-tip regin for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection with low or high concentration of the Mab. 9th Kumamoto AIDS Seminar. Sep. 18-19, 2008, Aso, Kumamoto.
- ⑩ 松下修三、西田吉辰、柴田潤二、畑田万紀子、吉村和久、: 長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 I; 中和単クローン抗体の作成と解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
- ⑪ 西田吉辰、柴田潤二、吉村和久、松下修三: 長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 II; 中和単クローン抗体の subtype B panel に対する交差中和活性. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
- ⑫ 畑田万紀子、吉村和久、柴田潤二、松下修三: 強力な抗 HIV-1 gp120-V3 抗体 KD-247 に対する HIV-1BaL の中和逃避のメカニズム解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2007. 11. 28-11. 30. 広島.
- ⑬ 柴田潤二、吉村和久、松下修三: 中和抗体高度抵抗性ウイルスを感受性にする変異は gp120 三量体構造に影響を与える. 第 21 回日本エイズ学会学術集

- 会・総会。 2007. 11. 28-11. 30. 広島。
- ⑭ 吉村和久、柴田潤二、畑田万紀子、山田裕子、増野弘幸、玉村啓和、松下修三：CD4 mimic small compound と anti-HIV monoclonal antibody のウイルス中和における相乗効果。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。 2007. 11. 28-11. 30. 広島。
- ⑮ 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三。 長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と組込み部位の関連性。 第 54 回日本ウイルス学会総会。 2006. 11. 18-21. 名古屋
- ⑯ 柴田潤二、吉村和久、小糸厚、松下修三。 抗 HIV-1 gp120-V3 抗体より逃避した V2 領域変異ウイルスの中和抵抗性メカニズムの解析。 第 54 回日本ウイルス学会総会。 2006. 11. 18-21. 名古屋
- ⑰ 吉村和久、柴田潤二、小糸厚、松下修三。 In vitro における抗 HIV-1 中和単クローン抗体とその他の薬剤との相互作用の研究。 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会。 2006. 11. 30-12. 2. 東京。
- ⑱ 松下修三。 シンポジウム 3 「より良い HAART に向けて」-耐性検査の意義とタイミング。 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会。 2006. 11. 30-12. 2. 東京。
- ⑲ Matsushita, S., Shibata, J., Honda, A., Murakami, T., Eda, Y., Koito, A., Yoshimura, K. Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implications for passive immunotherapy. AIDS Vaccine 2006 Conference, Amsterdam, the Netherlands, Aug. 29-Sep. 1, 2006.
- ⑳ Shibata, J., Yoshimura, K., Honda A., Murakami, T., Koito, A., and Matsushita, S. : A Role of Mutations in Non-V3 Envelope Regions for Escape from a Broad Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody, KD-247, during in vitro Selection. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006.
- ㉑ Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Murakami, T., Mitsuya, H., Koito, A., and Matsushita, S. : Resistance Profile of A Novel Broadly Neutralizing Anti-HIV Monoclonal Antibody, KD-247 That Has Favorable Synergism with Anti-CCR5 Inhibitors In Vitro. 13th Conference on

Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, USA, Feb. 4-9, 2006.

- ㉒ Ikeda, T., Shibata, J., Yoshimura, K., Koito, A., Matsushita, S. Recurrent HIV-1 integration at BACH2 locus in resting CD4+ T cell populations during effective HAART. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.
- ㉓ Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T., Matsushita, S. Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. 7th AIDS Seminar in Kumamoto, Sep 21-22, 2006.

〔産業財産権〕
○出願状況（計 2 件）

名称：抗 HIV モノクローナル抗体
発明者：松下修三
権利者：熊本大学
種類：特許
番号：特願 2007-299083
出願年月日：平成 19 年 11 月 19 日
国内外の別：国内

名称：抗 HIV モノクローナル抗体
発明者：松下修三
権利者：熊本大学
種類：PCT 特許
番号：PCT/JP2008/071035
出願年月日：平成 20 年 11 月 19 日
国内外の別：国外

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