

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430091

研究課題名(和文) 様々なSIV株を中和するB404抗体の解析による抗体誘導ワクチンのモデル系開発

研究課題名(英文) Development of antibody-inducing vaccine models by analysis of B404 which neutralizes various SIV strains

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HIV感染の動物モデルであるSIV感染サルを用い、抗体誘導ワクチンを開発するための解析を行なった。強力なSIV中和抗体であるB404の結合はEnvの点変異に影響されず、抗原認識部位の負電荷に偏った立体構造に依存した結合であることが示唆された。B404類似抗体の誘導にはサルによって大きな偏りがあり、宿主因子の影響が示唆された。また、抗体の成熟により接種ウイルスへの中和活性は上昇するが、他のウイルスへの交差中和活性は上がらないことが示された。

研究成果の概要(英文)：SIV-infected macaques, which is an animal model of HIV infection, was used for analysis to develop antibody-inducing vaccines. Binding of potent anti-SIV neutralizing antibody B404 was not affected by point mutations on Env, and was suggested to require the structure of antigen-binding domain with negative charges. The biased induction of B404-class antibodies in macaques suggested the effect of host factors in antibody induction. Moreover, maturation of antibodies resulted in increase of neutralization activity against homologous virus, but did not associated with cross-neutralization activity against heterologous viruses

研究分野：Virology

キーワード：antibody SIV vaccine HIV

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サブタイプを超えた多くの HIV-1 株に有効な中和抗体として、いくつかの強力な broadly neutralizing antibody (BnAb) が HIV-1 感染患者から分離され、効果的な抗体の誘導が HIV-1 に対するワクチンにとって重要であることが示された。桑田らは HIV 感染の動物モデルである SIV 感染サルから、SIV 中和抗体としては初めて BnAb B404 を分離した。また、B404 と同じ抗体遺伝子を使用し、同じエピトープを認識する B404 類似抗体が、4 頭の SIVsmH635FC 感染サル全頭で誘導されていることをあきらかにした。この結果、SIV サル・モデルにおいて抗体誘導ワクチンを研究することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究では、強力な抗 SIV 中和抗体 B404 について、その詳細な結合エピトープの同定や B404 抵抗性のメカニズムなどの基礎的な問題を解決し、さらにサル個体内での B404 類似抗体の検索や B404 エピトープを含んだ抗原のデザインを行う。これによって、強力な中和抗体を誘導するワクチンの動物モデルを確立し、有効な HIV-1 ワクチンの開発へと展開する。

### 3. 研究の方法

B404 抵抗性株に見られる変異や、構造解析から重要と予想された部位に変異をもつ Env 変異体を作製し、その B404 結合活性を解析して B404 結合と重要なアミノ酸残基を解析した。一方で、新たに SIVsmH635FC を接種したサルからバイオプシーによってリンパ節を取得して抗体ライブラリを構築し、ファージ・ディスプレイ法によるバイオパニングによって中和抗体の分離を行った。感染直後の未成熟な B404 類似抗体を分離するため、従来の PCR プライマーを用いた抗体ライブラリに加えて、B404 類似抗体に特異的な PCR プライマーを用いたライブラリ作成を行った。分離した Env 特異的抗体は、TZM-bl 細胞を用いた中和試験によってその中和活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗 SIV 抗体 B404 のエピトープの同定

抗 SIV 抗体 B404 の CDR 領域にはアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸が多くみられることから、これらのアミノ酸が Env との結合に重要ではないかと考え、B404 のエピトープと考えられる Env V3/V4 ループ近辺の塩基性アミノ酸をアラニンに置換する Env 点変異体を作成した。また、糖鎖依存性を調べるために糖鎖結合部位の Env 点変異体も作成した。合計 24 変異体の B404 結合活性をフローサイトメーターによって解析した結果、B404 への結合をわずかに減少させるアミノ酸変異を 4 種類同定で

きたが、これらの変異は CD4i エピトープを認識する K8 抗体の結合をより大きく減少させた。この結果は、変異による Env 構造全体の変化、不安定化の可能性を示唆しており、点変異体を用いた結合解析では B404 の結合に影響を与える変異を同定でなかった。

これらの点変異 Env を持ったシールドウイルスを作成し、B404 による中和活性への影響を調べた。24 変異株中 8 つの変異株は感染性が非常に低くなっており、中和への影響を調べられなかった。感染性のある変異株のうち、1 変異体でわずかに中和活性の低下が認められたが、他の変異株では、結合活性の減少が見られたものも含め、B404 への感受性に変化はなかった。これらの結果は、Env の点変異体の解析では B404 のエピトープを決定することが難しいことを示している。

Env 点変異体によるエピトープ同定ができなかったことは、B404 が直線的なエピトープを認識する抗体ではなく、Env の立体構造を認識していることと大きく関連していると考えられる。B404 の構造と表面電荷をコンピュータによって予測したところ、抗原と相互作用する部分に窪みがあり、内部が大きく負電荷に偏っていた (図 1)。この結果は、B404 抗体と Env の特定のアミノ酸間の強い結合が重要ではなく、B404 と Env の立体構造に依存した結合であることを強く示唆している。Env の 1 箇所塩基性アミノ酸をアラニンに置換しても、構造が維持されていれば B404 の結合に大きな影響を与えない可能性があり、B404-Env 複合体の結晶構造解析などの方法が詳細なエピトープの決定には必要である。

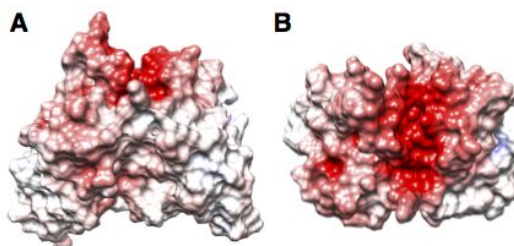
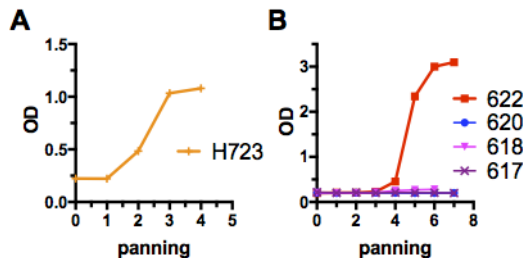


図 1 抗 SIV 抗体 B404 の構造と表面電荷。抗原反応部位を上部に向けた状態(A)と 90 度回転して抗原反応部位を上から見た状態(B)を示している。B404 の立体構造は Kotai Antibody Builder によって、表面電荷は Chimera によって推定した。赤が濃いところが陰性、青が濃いところが陽性の電荷を示す。

#### (2) SIV 感染サルからの中和抗体の分離 B404 類似抗体の分離

以前の解析では、長い CDR3 を持ち、VH3-33 を使用した重鎖と 軽鎖の使用が特徴的な B404 類似抗体が 4 頭の SIVsmH635FC 感染サルで高頻度に誘導されていた。この B404 類似抗体を、抗体の成熟が進んでいな

い感染の初期から分離するために、VH3-33 に特異的な PCR プライマーを設計した。B404 を分離した cDNA サンプルから、このプライマーを使用して抗体ライブラリを作成してバイオパニングを行なったところ、パニング 2 回目から特異抗体が検出され、分離した抗体の全てが B404 類似抗体であった (図 2)。この結果は、この系が B404 類似抗体を高感度に検出できることを示している。



**図 2** バイオパニングによる抗 Env 抗体分離。B404 を分離したサル H723(A) と 4 頭の新規 SIVsmH635FC 感染サル(B) から VH3-33 プライマーを用いて増幅した重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子による抗体ライブラリを作成してパニングを行い、抗 SIV 抗体を ELISA によって測定した。

そこで、新規に SIVsmH635FC に感染し、血漿の中和抗体活性の上昇がみられた 4 頭のアカゲザルの感染後 24 週のリンパ節から、この VH3-33 プライマーを用いて増幅した重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子による抗体ライブラリを作成し、Env 特異的抗体の分離を行なった。しかしながら、バイオパニングによって Env 特異的抗体が検出されたのは 1 頭だけで、分離された抗体も B404 類似抗体とは異なっていた (図 2)。同じサンプルから、従来法によって全ての重鎖と軽鎖を含むライブラリを作成し、抗体分離を行なったところ、B404 とは異なるタイプの多くの Env 特異的抗体が分離された。また、一部の抗体には中和活性が確認された。

これらの結果は、新たに SIVsmH635FC に感染したアカゲザルでは B404 類似抗体が誘導されておらず、他のタイプの中和抗体の誘導が優勢であることを示している。感染実験の条件はほぼ同じであることから、以前に B404 類似抗体が高頻度に誘導された 4 頭のアカゲザルと新規感染アカゲザルとは、抗体誘導に関わる宿主因子が異なっている可能性が示唆された。

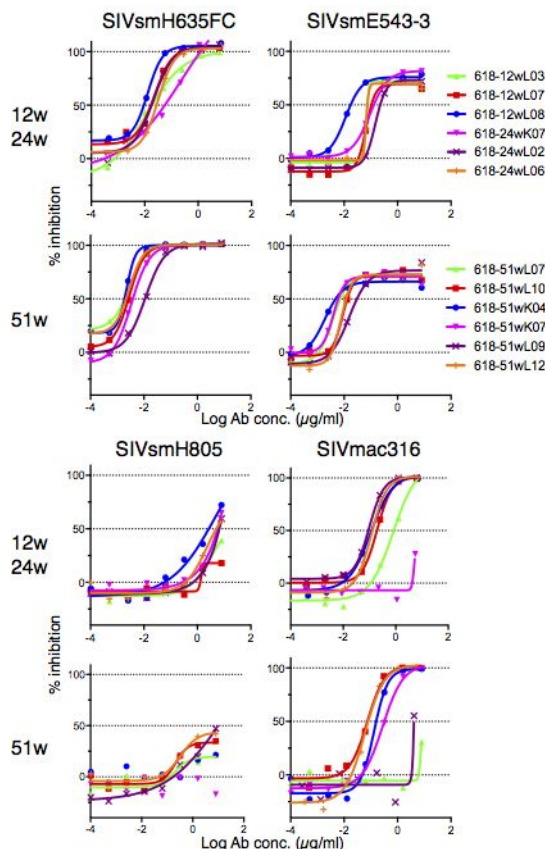
#### 中和抗体の成熟過程の解析

新規感染サルでは B404 類似抗体の誘導が見られなかったため、血漿の中和抗体価が高かった 2 頭について、従来法のライブラリ作成法によって 12, 24, 51 週に分離した中和抗体の遺伝子解析を行った。1 頭では VH1-59, VH4-38, もう 1 頭では VH1-53 を重鎖として使用する中和抗体が多くを占め、

これらの重鎖の全てが、HIV/SIV 感染で誘導される中和抗体に特徴的な 17 アミノ酸以上の長い CDR3 を持っていた (図 3)。また、1 頭は軽鎖を持つ中和抗体がほとんどで、もう 1 頭では軽鎖と軽鎖の両方の誘導がみられた。

Macaque	L-chain	Clone	V gene	CDHR3
MM617	kappa	617-51wK01	VH1.53	ARGDVVMVSSPHLYGLDY
		617-51wK03	VH1.53	ARGDVVLVSSPHLYGLDF
		617-51wK12	VH1.53	ARGDVVLVSSPHLYGLDF
		617-51wK15	VH1.53	ARGDVVMVSSPHLYGLDY
		617-51wK18	VH1.53	ARGDVVMVSSPHLYGLDY
	lambda	617-12wL02	VH4.28	ARDNFYEEDYGYFTWFDSD
MM618	kappa	618-24wK07	VH1.59	ATSYGSGLYSFGGGLDS
		618-51wK04	VH1.59	ATSYGSGIYSFGGGLDS
		618-51wK07	VH1.59	ATSYGSGIYSFGGGLDS
	lambda	618-12wL03	VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDY
		618-12wL07	VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDY
618-12wL08		VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDY	
618-24wL06		VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDY	
		618-51wL07	VH4.38	ARAPYEDDYGFYTLTSPDY
		618-51wL09	VH4.38	ARSLFYFGNTYYTGEWNSLDV
		618-51wL10	VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDS
		618-51wL12	VH4.38	ARAPGYEDDYGFYTLTSPDS

**図 3** 分離した中和抗体の遺伝子の特徴。2 頭の感染サルから分離した中和抗体の重鎖が使用している VH 遺伝子と CDR3 領域を示す。



**図 4** 様々なウイルス株に対する中和活性。アカゲザル MM618 から分離された抗体の 4 種類のウイルス株に対する中和活性を示す。

分離した抗体の 5 株の SIV に対する中和活性を調べたところ、接種ウイルスである SIVsmH635FC 株とそれに近縁で中和抵抗性

の高い SIVsmE543-3 株に対する中和活性は、感染後 12 週、24 週に分離された抗体よりも 51 週に分離された抗体の方が高くなっていた (図 4)。一方、接種ウイルスと遺伝的に異なる SIVsmH805 株、SIVmac316 株に対する中和活性は、分離時期による違いがみられなかった。高度に中和抵抗性である SIVmac239 株に対する中和活性は、これらの抗体ではみられなかった。

これらの結果は、この 2 頭では感染による抗体の成熟が接種ウイルスに対する中和活性の強化の方向に進んでおり、様々なウイルス株に対応するための交差中和活性の上昇とは関連していないことを示している。

#### 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 5 件)

Maruta Y, Kuwata T, Tanaka K, Alam M, Valdez KP, Egami Y, Suwa Y, Morioka H, Matsushita S. 2016.

Cross-Neutralization Activity of Single-Chain Variable Fragment (scFv) Derived from Anti-V3 Monoclonal Antibodies Mediated by Post-Attachment Binding. *Jpn J Infect Dis* 69:395-404. 査読有

Kuwata T, Enomoto I, Baba M, Matsushita S. 2016. Incompatible Natures of the HIV-1 Envelope in Resistance to the CCR5 Antagonist Cenicriviroc and to Neutralizing Antibodies. *Antimicrob Agents Chemother* 60:437-450. 査読有

Alam M, Kuwata T, Shimura K, Yokoyama M, Ramirez Valdez KP, Tanaka K, Maruta Y, Oishi S, Fujii N, Sato H, Matsuoka M, Matsushita S. 2016. Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. *Retrovirology* 13:70. 査読有

Ramirez Valdez KP, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, Matsushita S. 2015. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. *Virology* 475c:187-203. 査読有

Guo K, Halemano K, Schmitt K, Katuwal M, Wang Y, Harper MS, Heilman KJ, Kuwata T, Stephens EB, Santiago ML. 2015. Immunoglobulin VH gene diversity and somatic hypermutation during SIV infection of rhesus macaques. *Immunogenetics* 67:355-370. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

Kuwata T, Sano M, Matsuoka S, Shimizu M, Miura T, Seki Y, Akari H, Matano T and Matsushita S: Induction of antibodies, which belonged to the same class as broadly neutralizing antibody B404, in macaques infected with SIVsmH635FC. 17th Kumamoto AIDS Seminar. October 31-November 2, 2016. くまもと県民交流館パレア (熊本)

Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Kawanami Y, Matsushita S: Post-attachment Neutralization of a Wide Range of HIV-1 Strains by Anti-CD4i Single Chain Variable Fragment (scFv). HIVR4P 2016, October 17-21, 2016, Chicago (USA)

Stanoeva K, König A, Fukuda A, Kawanami Y, Kuwata T, Satou Y, Matsushita S: HIV proviral DNA quantification in a cohort of Japanese patients on long-term ART. 2016 Towards an HIV Cure Symposium, July 16-17, 2016, Durban (South Africa)

Kuwata T, Enomoto I, Baba M and Matsushita S: Incompatibility of HIV-1 Resistance to Both Cenicriviroc and Neutralizing Antibodies. The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 22-25, 2016, Boston (USA)

Kuwata T, Shimizu M, Matsushita S: Impact of gp41 mutations on resistance to B404, a broad neutralizing antibody reactive against a conformational epitope of SIV gp120. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月 22-24 日, 福岡国際会議場 (福岡)

Kuwata T, Shimizu M, Matsushita S: Impact of gp41 mutations for escape from a broad neutralizing antibody against SIV. 16th Kumamoto AIDS Seminar. October 7-9, 2015. ホテル日航熊本 (熊本)

Tanaka K, Kuwata T, Maruta Y, Ramirez Valdez K P, Alam M, Egami Y, Enomoto I, Kawanami Y, Matsushita S: Potent and broad neutralizing activity of small antibody fragments targeting CD4i (CD4-induced) epitope. The 8th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention the Vancouver, July 19-22, 2015, Vancouver (Canada)

Muntasir A, Kuwata T, Ramirez Valdez K P, Maruta Y, Tanaka K, Shimura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M, Matsushita S: Enhanced Neutralization of HIV-1 with Fusion Inhibitor Resistant Mutations.

The annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 23-26, 2015, Seattle (USA)

Matsushita S, Ramirez Valdez K P, Maruta Y, Tanaka K, Muntasir A, Kuwata T, Pisupait J, Murakami T, Yoshimura K: Therapeutic application of neutralizing antibodies based on the recent data on complementary and synergistic activities against a wide range of HIV-1 strains. The 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases January 26-27, 2015. Taipei (Taiwan)

桑田岳夫、松下修三：強力な抗 SIV 中和抗体 B404 からの逃避メカニズムの解析 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会、2014 年 12 月 3-5 日、大阪国際会議場（大阪）

Kuwata T, Yoshimura K, Wu F, Ourmanov I, Hirsch V M, Yokoyama M, Sato H and Matsushita S: Mutations in gp41 is Critical to Escape from B404, a Broad Neutralizing Antibody Against SIV, Which Recognizes a V3/V4 Conformational Epitope. The 32nd Annual Symposium for Nonhuman Primate Models for AIDS, November 11-14, 2014, Portland (USA)

Maruta, Y, Kuwata, T, Tanaka K, Nakahara, Y, Ramirez Valdez K P, Alam, M, Egami, Y, Hirata I, Suwa, Y, Morioka, H, Matsushita, S: Mechanism of post-attachment neutralization of single-chain variable fragment (scFv) from anti-V3 monoclonal antibody against HIV-1. HIV R4P 2014, October 28-31, 2014, Cape Town (South Africa)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://matsushita-lab.jp/>

#### 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  
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

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

(4) 研究協力者  
なし