

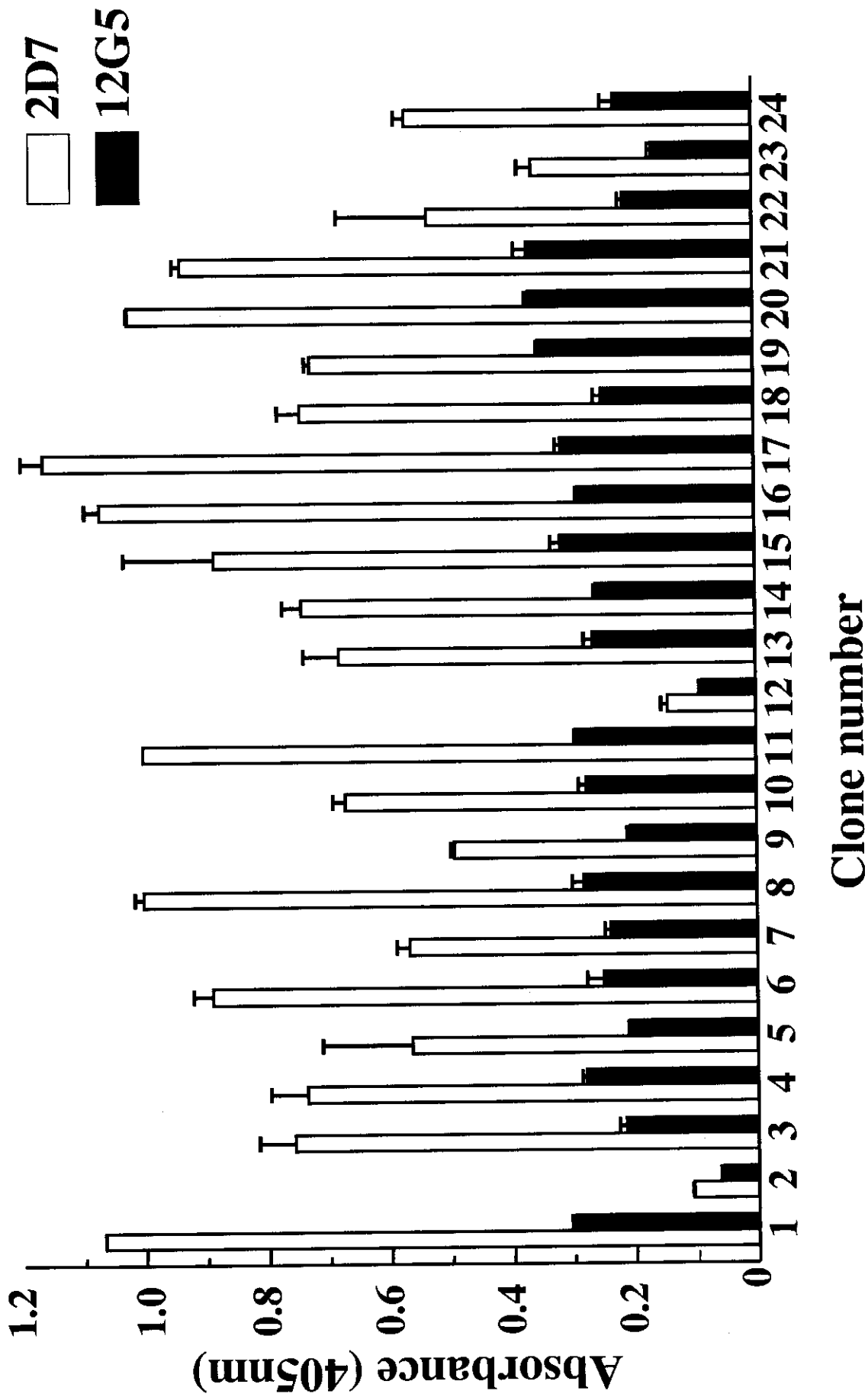
4. 二谷綾、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、可溶性 FcεR1a 鎖に結合するヒト scFV 抗体ファージクローンの単離、日本免疫学会、12 月、仙台、2000
5. 山本真紀、加治正知、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、ケモカイン、MCP-1 のペプチドミミック、日本免疫学会、11 月、仙台、2000
6. 御手洗睦和、吉満正明、新村靖彦、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、抗 CCR5 抗体 (2D7) に結合するペプチドモチーフの解析、日本免疫学会、11 月、仙台、2000
7. 碓正臣、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、MCP-1 に結合するヒト一本鎖抗体発現ファージクローンの単離、日本免疫学会、11 月、仙台、2000
8. 奥園剛、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、ヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いた抗 TNFR1 抗体の検索、日本免疫学会、11 月、仙台、2000
9. 橋口周平、二谷綾、吉永圭介、山本真紀、伊東祐二、杉村和久、CD28-Fc/CTLA4-Fc 発現ベクターによるスキン免疫、日本免疫学会、11 月、仙台、2000
10. Sugimura, K., Kaji, M., Hashiguchi, S., Ito, Y., Yoshimura, T., Kuratsu, J., Analysis of peptide motifs recognized with anti-MCP-1 monoclonal antibody, Gordon Conference of Peptide, Chemistry & Biology, February, 2000
11. A. Meta, N. Torigoe, Y. Ito, R. Arakaki, H. Nakashima, K. Sugimura, Peptide-motif analysis of phage clones recognized by anti-CCR5 monoclonal antibody, The 10th International Congress of Immunology, (Ed. by G. P. Talwar, I. Nath, N. K. Ganguly and K. V. S. Rao), pp. 1475-1479, 1998
12. Y. Ito, K. Ezaki, Y. Oomura, S. Takada, K. Sugimura, Affinity maturation in peptide mimics of CTLA4-binding domain, The 10th International Congress of Immunology, (Ed. by G. P. Talwar, I. Nath, N. K. Ganguly and K. V. S. Rao), pp. 125-129, 1998
13. S. Hashiguchi, S. Akasaki, Y. Ito, K. Sugimura, FACS analysis of the gene 3 protein derived from a phage library clone with T-cell proliferation-augmenting activity, The 10th International Congress of Immunology, (Ed. by G. P. Talwar, I. Nath, N. K. Ganguly and K. V. S. Rao), pp. 383-386, 1998
14. K. Sugimura, T. Fukumoto, N. 15. Torigoe, Y. Ito, S. Hashiguchi, Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation, The 10th

International Congress of  
Immunology, (Ed. by G. P. Talwar,  
I. Nath, N. K. Ganguly and K. V. S.  
Rao), pp. 373-378, 1998

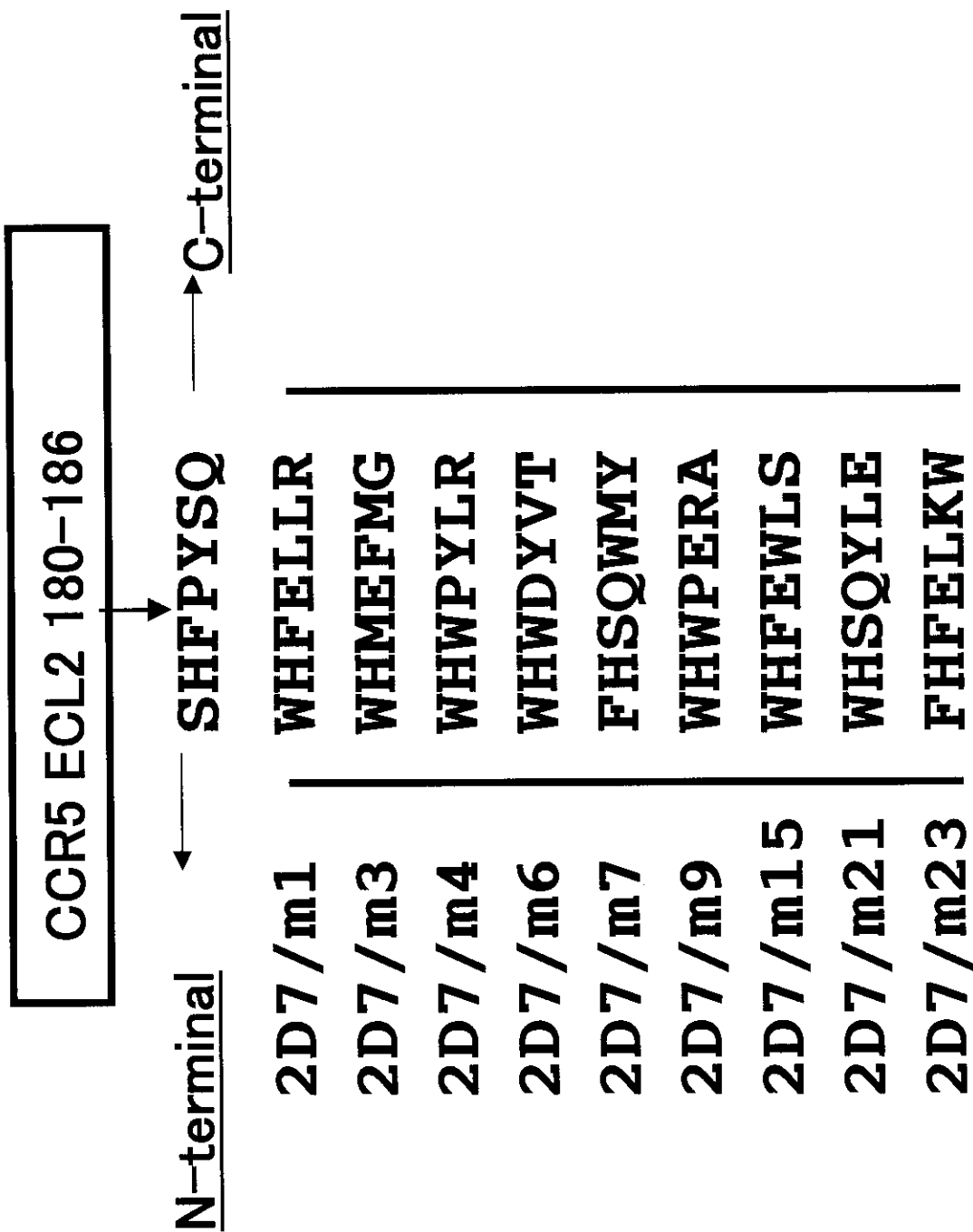
5. 知的所有権の取得状況

2D7/m6、C27、G25、および FcεRI、TNFR1、  
IL-6、MCP-1 に特異的なヒト scFV 抗  
体の特許を申請中

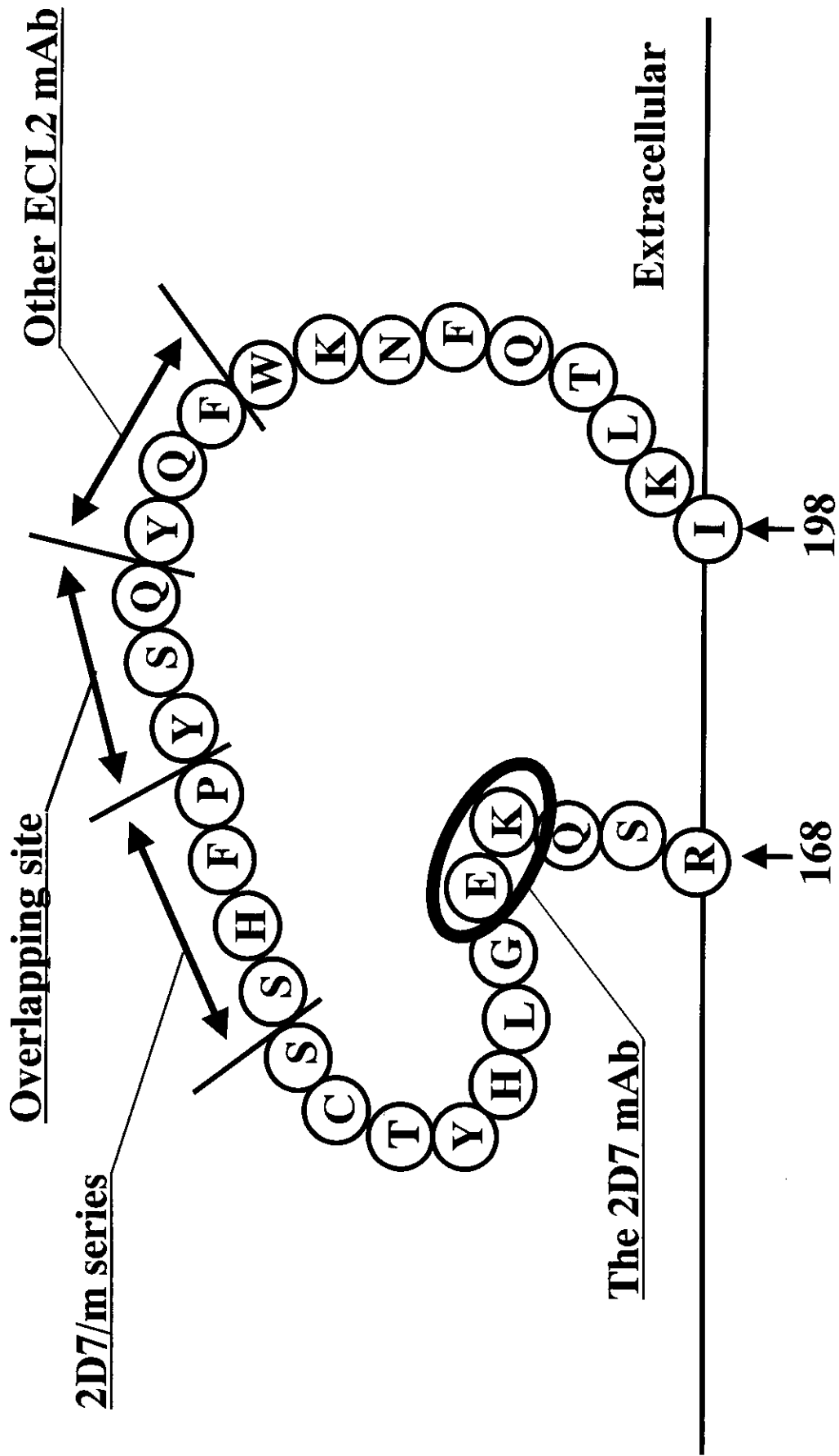
# Primary Screening of 2D7-binding Phage Clones



# Homology analysis of 2D7/m series



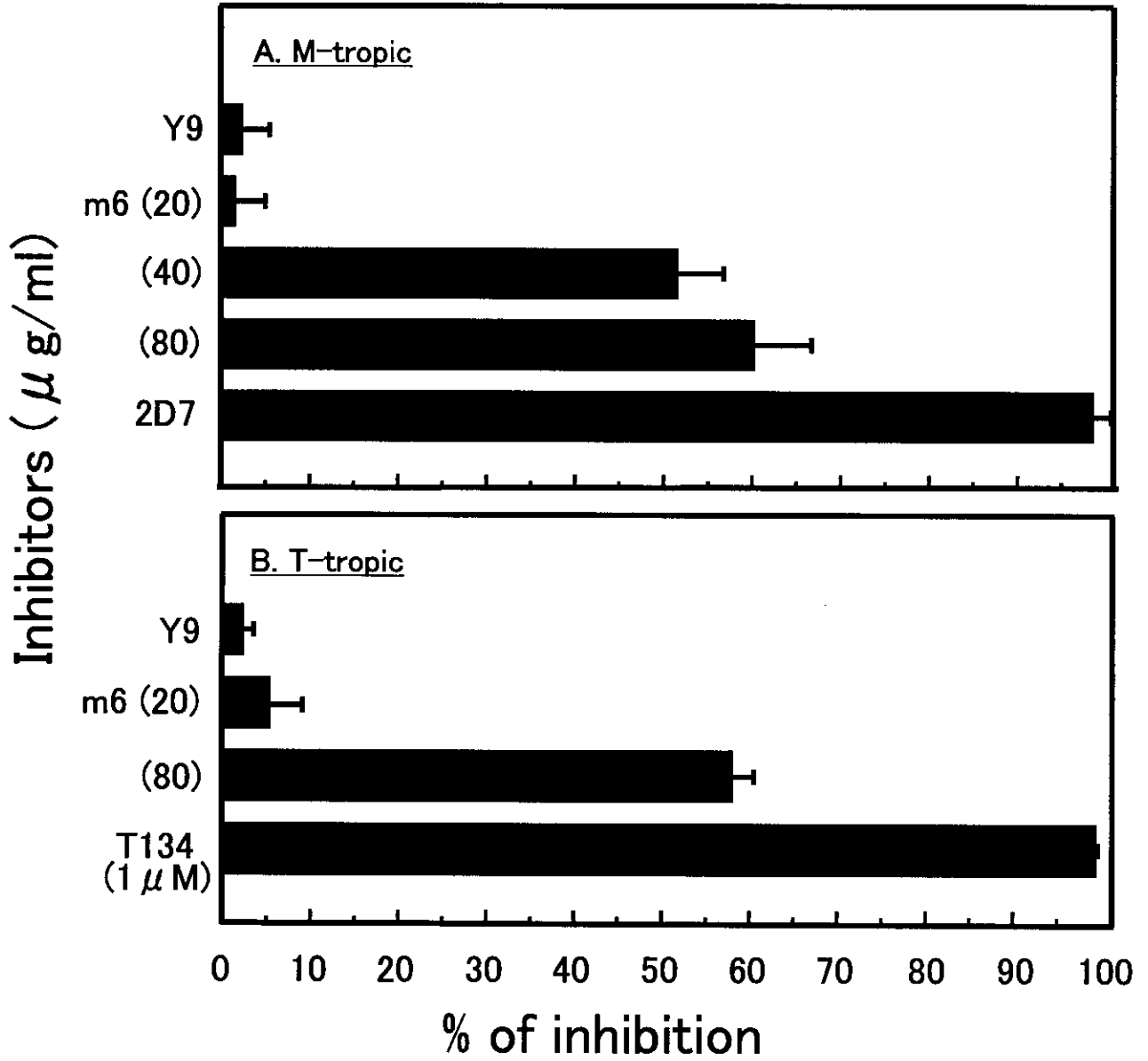
# Homology Analysis on ECL2



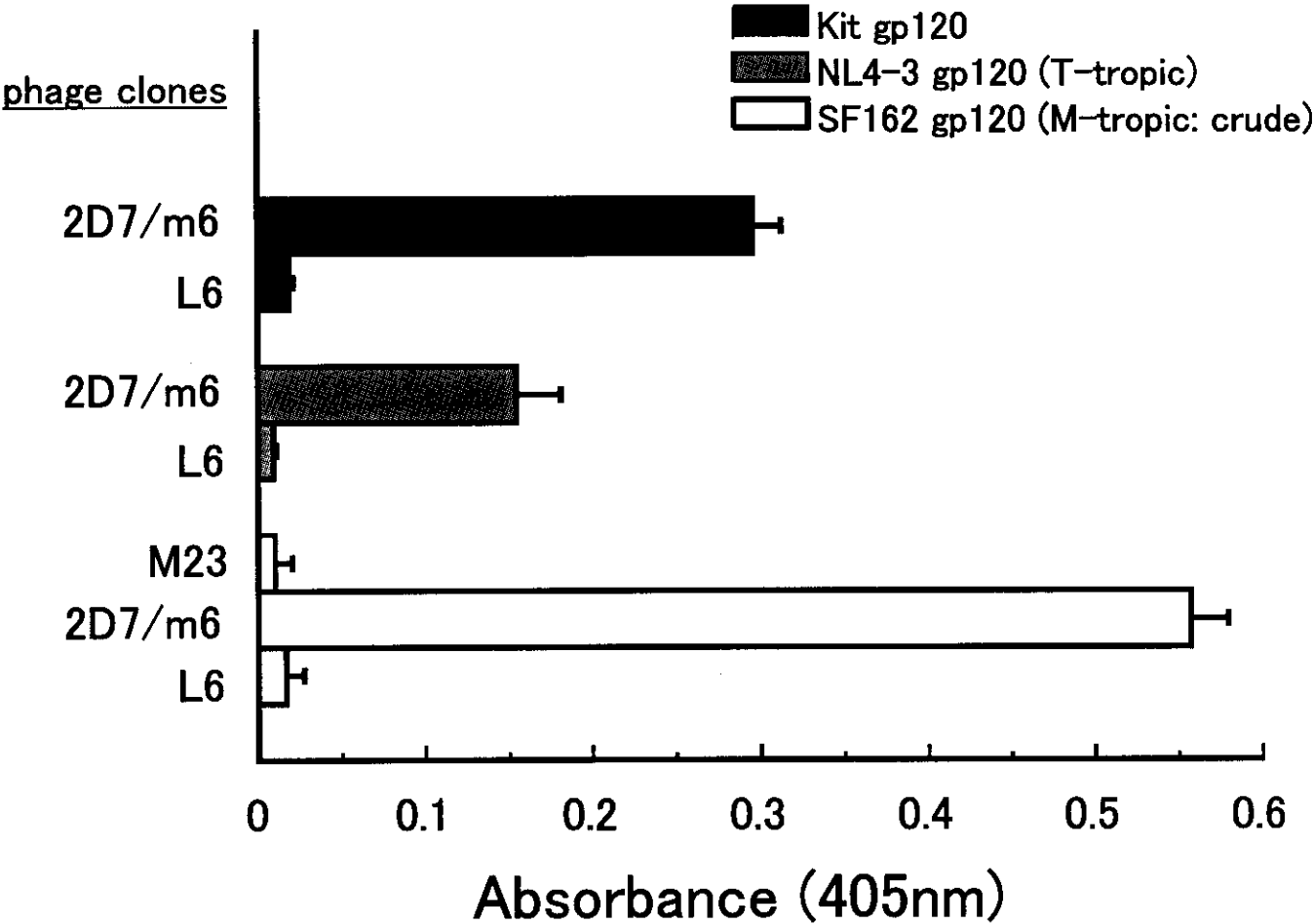
Benhur L., et al., J. Biol. Chem.: 274, 9617-9626, 1999

Salvatore J. S., et al., J. Biol. Chem.: 274, 1905-1913, 1999

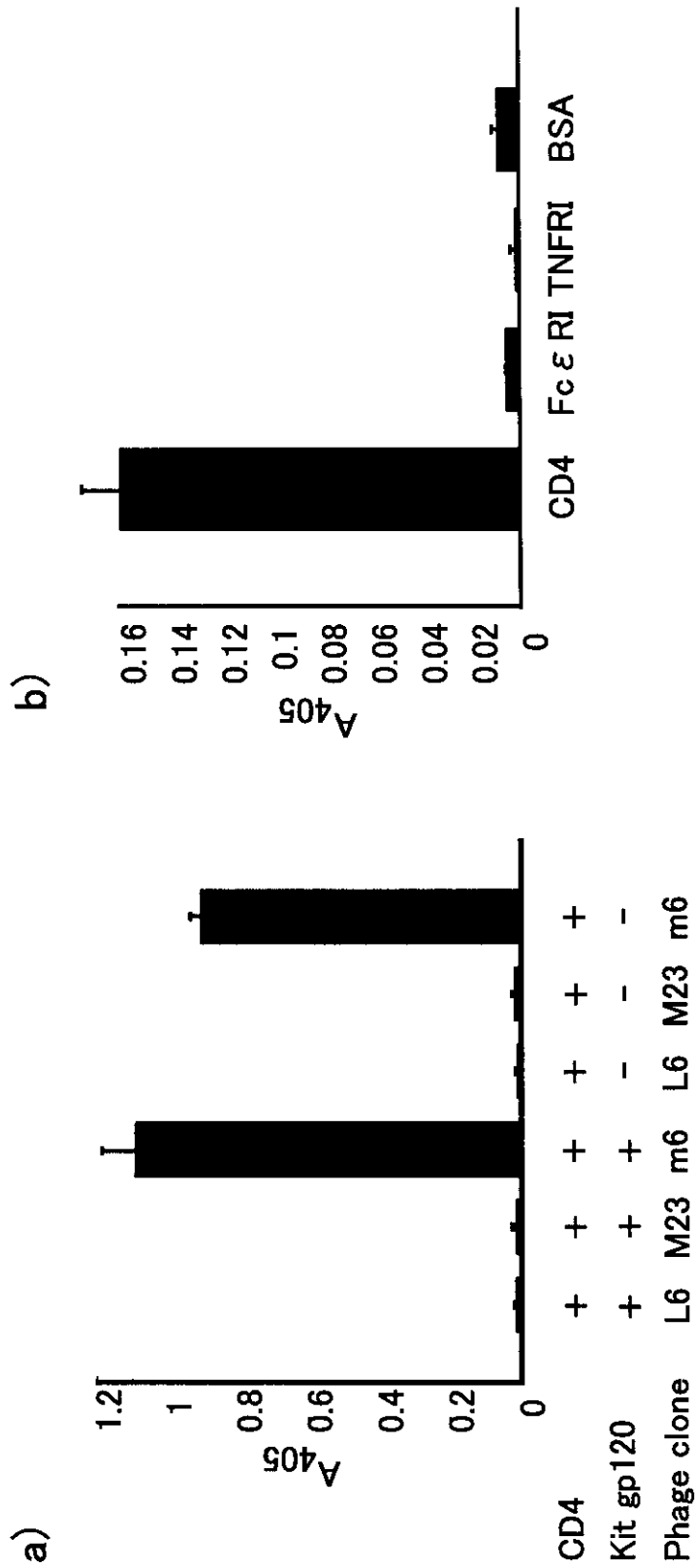
# Inhibitory activity of the 2D7/m6 phage clone to HIV-1 infection



# 2D7/m6 binds to the gp120



# Binding specificity of 2D7/m6 to CD4





## Cross-clade immunodominant CTL エピトープの同定とその解析

分担研究者 滝口雅文 熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野・教授

研究要旨：既に報告されている8つの HLA-A11 拘束性 HIV-1 clade B CTL エピトープのシーケンスを、報告されている HIV-1 clade B および clade E で調べた。このうち3つのエピトープは clade B と clade E 間で保存されていた。一方、他の5つのエピトープは2つの clade 間で異なっていた。保存されていた3つのエピトープペプチドで、clade E に感染したタイ人および clade B に感染した日本人の末梢血単核球 (PBMC) を刺激したところ、特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導できた。一方、clade B および clade E 間でシーケンスが異なっていた5つのエピトープのうち、3つのエピトープは、それぞれ clade B および clade E 感染者で特異的に認識された。残りの2つのエピトープは clade B 特異的であり、clade E 感染者には認識されなかった。6種類の clade E エピトープを認識する CTL は、HIV-1 clade E ウイルスを感染させた細胞 (721.221-CD4-A\*1101) を効果的に傷害し、これらのエピトープは HIV-1 感染細胞で T 細胞に提示されていることが明らかになった。

### A. 研究目的

アジア人に共通に見られる HLA クラス I 抗原が提示する HIV-1 clade B に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープを、リバース・イムノジェネティクス法にて同定する。さらに、これを用いてアジアで流行している他のサブタイプ (E および C) エピトープを同定し、これによって cross-clade エピトープを明らかにする。これらのエピトープを用いてテトラマー (HLA クラス I・ペプチド4量体) を作製し、HIV-1 感染者のサンプルを多数解析することにより、CTL が強く誘導されている免疫原性の強いエピトープを明らかにする。これによってアジアでの CTL 誘導ワクチンの開発に利用できるエピトープを明らかにする。本年度は、HLA-A\*1101 clade B CTL エピトープより clade B および clade E 間の cross-clade CTL エピトープを同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) ペプチドの選択

明らかになっている8種類の HLA-A\*1101 HIV-1 clade B CTL エピトープ部分に一致する clade E 特異的ペプチドを合成する。

#### 2) HLA-A\*1101 ペプチド結合アッセイ

ペプチドと HLA-A\*1101 との結合を、RMA-S-A\*1101 細胞を用いた HLA-A\*1101 stabilization assay によって測定する。

#### 3) 特異的 CTL の誘導

HLA-A11 をもった HIV-1 慢性感染症の日本人およびタイ人から分離した末梢血単核球 (PBMC) を、これらのペプチドで刺激し、IL-2 を含んだ培養液で2週間培養した。2週間後にそれぞれのペプチドに対する CTL 活性を Cr releasing 法によって調べた。

#### 4) HIV-1 clade E ペプチド特異的 CTL クロンの作製

Pol 675-683-5E に対する CTL クローンを、

限界希釈法によって作製した。

- 5) HIV-1 clade E クローン感染細胞に対する CTL クローンおよび CTL 株の細胞傷害活性  
HIV-1 clade E クローン、p93JP-NH1 を 721.221-CD4-A\*1101 株に感染させ、約 95% の細胞が感染した所で CTL 活性を調べた。

#### (倫理面への配慮)

HIV-1 感染者の末梢血リンパ球を本研究に使用することはインフォームドコンセントにより確認した。また、その研究成果発表においては、各個人が識別できないように配慮をした。

### C. 研究結果

#### 1) cross-clade CTL エピトープ

clade B 及び clade E 間でシークエンスが一致した3つのエピトープ (Pol 313-321, Pol 424-432, Pol 894-903) に関して、HLA-A11 陽性で、HIV-1 慢性感染症の日本人及びタイ人の PBMC を合成ペプチドにて刺激して、2週間培養して CTL の誘導を試みた (表1)。

Pol 313-321 に特異的な CTL 活性が、5人の日本人のうち3人に、また6人のタイ人のうち5人に見られた。また Pol 424-432 及び Pol 894-903 に特異的な CTL 活性が、5人の日本人のうちそれぞれ1人に、7人のタイ人のうちそれぞれ6人と1人に見られた。このことから、これらのエピトープは clade B 及び clade E 間の cross-clade CTL エピトープで有ると考えられた。

これらのエピトープの免疫原性は、Pol 313-321 は clade B 及び clade E で強く、Pol 424-432 は clade B で弱く clade E で強く、Pol 894-903 はどちらの clade でも弱いと考えられた。

#### 2) clade B 及び clade E 特異的 CTL エピトープ

clade B と clade E 間でシークエンスが一致していない5つのエピトープ (Pol 675-683, Nef

84-92, Gag 83-90, Gag 349-359, Env 202-210) に関して、clade E 及び clade B 特異的エピトープペプチドを作製して、同様に HLA-A11 陽性、HIV-1 慢性感染症の日本人及びタイ人の PBMC から特異的 CTL の誘導を試みた (表1)。

clade B 特異的 Pol 675-683 は、5人の日本人中1人で CTL 活性がみられたが、clade E 特異的 Pol 675-683-5E および Pol 675-683-5K8E は、7人のタイ人中、それぞれ3人および2人で CTL 活性がみられた。CTL によるこれらの clade B および clade E 特異的シークエンス間の cross-recognition は認められなかった。よって、このエピトープ clade B および clade E 特異的であると考えられた。

clade B 特異的 Nef 84-92 および Nef 84-92-2L は、5人の日本人のうちそれぞれ3人ずつで、特異的 CTL 活性がみられた。一方、clade E 特異的 Nef 84-92-2F6F は7人のタイ人のうち6人で CTL 活性が認められた。CTL によるこれらの clade B および clade E 特異的シークエンス間の cross-recognition は見られず、このエピトープは clade B および clade E 特異的と考えられた。

clade B 特異的 Gag 349-359 は、5人の日本人のうち4人で特異的 CTL 活性が見られた。一方、clade E 特異的 Gag 349-359-9S は、7人のタイ人のうち3人で特異的 CTL 活性が見られた。やはり、CTL によるこれらの clade B および clade E 特異的シークエンス間の cross-recognition は見られず、このエピトープも clade B および clade E 特異的と考えられた。

同様にして Env 202-210 および Gag 83-90 の clade B および clade E 特異的シークエンスについて、CTL 活性を調べたが、clade E 特異的シークエンスペプチド (Env 202-210-4K および Gag 83-90-3W) は、タイ人では CTL が誘導されず (表1)、clade E では CTL エピトープになっていないと考えられた。

### 3) HIV-1 clade E ウイルス感染細胞の特異的 CTL による認識

3つの clade E 特異的エピトープに対する CTL と、3つの cross-clade エピトープに対する CTL が、HIV-1 感染細胞で提示されるエピトープを認識して HIV-1 感染細胞を殺すかを調べた。標的細胞としては、HLA クラス I 抗原を発現していない 721.221 細胞 (CXCR4 陽性) に、CD4 と HLA-A\*1101 を遺伝子導入して発現させた 721.221-CD4-A\*1101 細胞を用いた。HIV-1 clade E クローンである p93JP-NHI を感染させ、約 95% の細胞が HIV-1 に感染した時点で、この感染細胞に対する CTL 活性を調べた。すべて 6 種類のエピトープに対して特異的 CTL は、感染細胞に特異的に細胞傷害性を示した (図 1)。このことから、これら 6 種類のエピトープは、HIV-1 感染細胞でエピトープを T 細胞に提示していると考えられた。

#### D. 考察

HLA-A11 はタイで最も高頻度に見られる HLA クラス I アリールであり、またこのアリールは日本を含めた東・東南アジア地区で高頻度に見られるアリールである。よってアジアでのエイズの CTL の研究、ワクチンの開発には HLA-A11 によって提示される HIV-1 CTL エピトープを同定することがきわめて重要である。

アジアでは clade B に加えて、タイを中心とした東南アジアでは clade E、インドを中心とした東アジアでは clade C が、そして最近では中国南西部でこの両方が流行している。このためアジアでのエイズ予防ワクチンを考えると、これらの clade ウイルスに対してすべて効果的なワクチンが望ましい。すなわち、cross-clade CTL エピトープを見つける必要がある。本研究によって我々は clade B と clade E 間の 3 つの cross-clade CTL エピトープを同定した。このうち Pol 313-321 は clade B および clade E に感染しているいずれの人でも、強く認識されるエピトープである。さらにこのエピトープシーケンスは、clades

A-E で保存されており、clade C に感染している人でも、強いエピトープとして認識されている可能性が高い。このことから CTL を誘導するワクチン開発に重要なエピトープと考えられる。

HIV-1 clade E に対する CTL エピトープは、まだ報告されておらず、今回我々が同定した 3 つの cross-clade エピトープと 3 つの clade E 特異的 CTL エピトープは、はじめての clade E CTL エピトープである。このうち Pol 894-903 は、7 人のタイ人のうち 1 人で、わずかに弱い CTL 活性を誘導できたのみで、強いエピトープとはいえない。残りの 5 つのエピトープは高い CTL 活性を多数のタイ人で誘導できており、重要なエピトープと考えられる。さらに、これらの CTL は HIV-1 clade E ウイルスを感染させた細胞を傷害したことより、clade E ウイルスが感染している細胞で効果的に T 細胞に提示されるエピトープと考えられる。

今後これらのエピトープを用いたテトラマーを作製し、多数の HIV-1 clade E 感染者の末梢血中の CTL をテトラマーを用いた *ex vivo* の解析をおこない、免疫原性を明らかにしていく予定である。

#### E. 結論

HLA-A\*1101 拘束性、HLA clade B CTL エピトープを用いて、3 つの cross-clade CTL エピトープおよび 3 つの clade E 特異的 CTL エピトープの同定に成功し、はじめて clade E CTL エピトープを明らかにした。さらにこれらのエピトープ特異的 CTL が、効果的に HIV-1 clade E 感染細胞を傷害することを示し、これらのエピトープが HIV-1 感染細胞で CTL に提示していることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takiguchi, M., T. Matsuda, H. Tomiyama, and K. Miwa: Analysis of three HLA-A\*3303 binding peptide anchors using an HLA-A\*3303 stabilization assay. *Tissue Antigens*. 55: 296-302, 2000.

- 2) Tomiyama, H., S. Oka, G. S. Ogg, S. Ida, A. J. McMichael and M. Takiguchi: Expansion of HIV-1-specific CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in chronically HIV-1 infected individuals. *AIDS*. 14: 2049-2051, 2000.
- 3) Tomiyama, H., N. Yamada, H. Komatsu, K. Hirayama, and M. Takiguchi: A single CTL clone can recognize a naturally processed HIV-1 epitope presented by two different HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 30: 2521-2530, 2000.
- 4) Maenaka, K., T. Maenaka, H. Tomiyama, M. Takiguchi, D. I. Stuart and E. Y. Jones: Nonstandard peptide binding revealed by crystal structures of HLA-B\*5101 complexed with HIV immunodominant epitopes. *J. Immunol.* 165: 3268-3274, 2000.
- 5) Takiguchi, M., T. Matsuda and H. Tomiyama: Polarity of the P1 anchor residue determines peptide binding specificity between HLA-A\*3101 and HLA-A\*3303. *Tissue Antigens*. 56: 501-506, 2000.

## 2. 学会発表

- 1) Fukada, K., H. Tomiyama, K. Miwa, Yutaro Kaneko, S. Oka, Y. Takebe, C. Wasi, and M. Takiguchi. CTL recognition for HLA-A\*1101-restricted HIV-1 cross-clade epitopes. Keystone Symposium "Novel biological approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology" (Keystone, Colorado, USA) April 4-10, 2000.
- 2) 深田勝彦、富山宏子、岡慎一、武部豊、滝口雅文  
(2000) HIV-1 cross-clade CTL エピトープの同定  
第14回日本エイズ学会学術集会・総会（京都）  
平成12年11月28日～30日

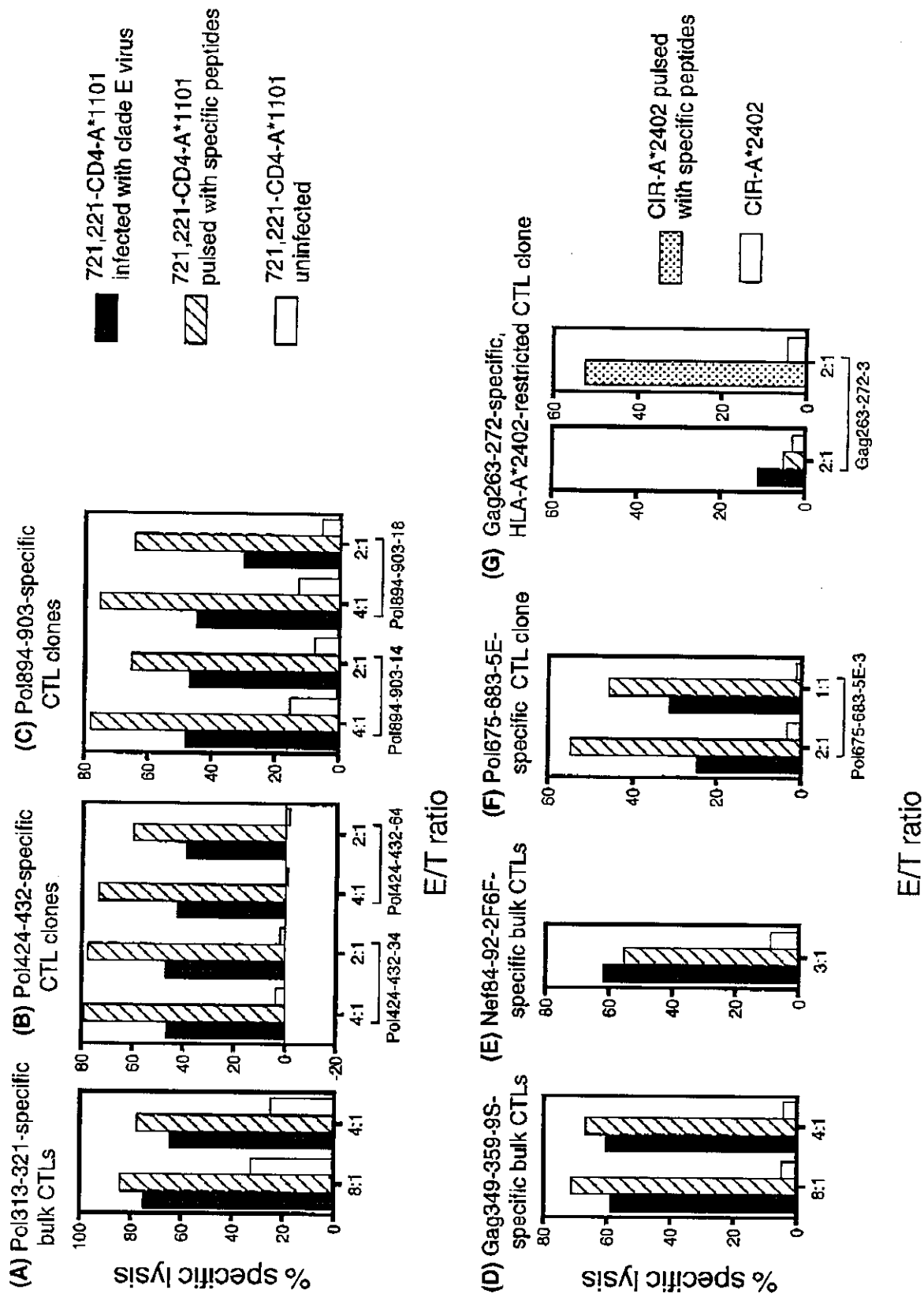


図1 cross-clade specific 及びclade E-specific CTLによるHIV-1 clade E 感染細胞の傷害

表1 CTL activities in PBMC from HIV-1-seropositive individuals carrying HLA-A\*11 after *in vitro* stimulation with HLA-A\*1101-restricted HIV-1 epitope peptides.

peptide	sequence	Relative specific lysis (%)#											
		clade B-infected individuals						clade E-infected individuals					
		KI-005	KI-015	KI-030	KI-035	KI-036	TT-005	TT-007	TT-008	TT-009	TU-002	TU-003	TU-007
Po1313-321	AIFQSSMTK	<b>53.5</b>	0.8	-1.7	<b>13.7</b>	<b>67.3</b>	N.T.	<b>81.8</b>	<b>72.4</b>	<b>100.8</b>	<b>89.7</b>	1.5	<b>93.2</b>
Po1424-432	QIYAGIKVK	<b>27.5</b>	2.4	-3.7	-0.2	1.0	<b>16.8</b>	<b>71.1</b>	<b>47.3</b>	<b>43.5</b>	<b>83.7</b>	-0.7	<b>64.9</b>
Po1894-903	AVFIHFRKK	-1.0	1.0	-1.4	<b>38.0</b>	-1.3	1.9	4.1	<b>12.5</b>	8.7	7.7	-1.6	-4.6
Po1675-683	QIEQLIKK	4.0	3.4	0.3	<b>19.9</b>	4.2	3.4*	<b>55.1</b>	<b>23.4</b>	<b>63.8</b>	3.4	0.2	5.7
Po1675-683-5E	-----E----						-4.1	<b>21.7</b>	<b>10.3</b>	4.5	5.6	-5.6	N.T.
Po1675-683-5K8E	----K--E-												
Nef84-92	AVDLSHFLK	<b>25.3</b>	<b>68.6</b>	6.6	5.8	<b>16.5</b>	-1.3*	<b>24.6*</b>	<b>75.5</b>	<b>76.5</b>	<b>15.4</b>	<b>41.2</b>	<b>64.2</b>
Nef84-92-2L	-L-----	<b>68.3</b>	6.3	5.5	<b>16.4</b>	<b>50.4</b>							
Nef84-92-2F6F	-F---F---												
Gag349-359	ACOGVGGPGHK	<b>61.7</b>	<b>21.8</b>	-1.2	<b>70.6</b>	<b>78.4</b>	4.0	<b>84.3</b>	<b>82.9</b>	<b>40.4</b>	3.9	-2.8	3.4
Gag349-359-9S	-----S---	8.4		5.6									
Env202-210	SVITQACPK	<b>21.3</b>	<b>13.4</b>	1.5	<b>19.2</b>	0.6	6.0	-1.4	1.3	6.2	1.3	4.7	1.6
Env202-210-4K	---K----												
Gag83-90	TLYCVHQR	2.3	5.7	2.9	3.7	3.4							
Gag83-90-8K	-----K	0.3	1.7	7.9	3.3	<b>48.1</b>							
Gag83-90-3W	--W-----						2.0	-2.5	-6.2	4.4	1.3	6.8	-1.1

# Relative specific lysis is the percentage of specific lysis of Tm-EBV-transformed cells pulsed with the peptide (1  $\mu$ M) minus that of cells without the peptide at an effector:target (E:T) ratio of 40:1 (\*30:1) by a bulk T cell culture 14 days after the 1st. stimulation. Bold letters show positive responses (more than 10% relative specific lysis).

## レトロウイルスgag抗原上の感染防御エピトープと ペプチドワクチン投与マウスで誘導されるエフェクター機構の解析

分担研究者： 宮澤正顕（近畿大学医学部免疫学教室）

共同研究者： 岩波礼将・丹羽淳子・河原佐智代・菅原大輔（近畿大学医学部免疫学教室）

研究要旨： マウスレトロウイルスgag遺伝子産物上には、そのMA蛋白質の範囲に複数の感染防御性及びCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが存在する。部分遺伝子の発現と合成ペプチドの利用により、感染防御エピトープの詳細な構造解析が進みつつある。一方、env遺伝子産物上に我々が同定した感染防御性のCD4陽性T細胞認識抗原エピトープについて、これを単独で含むペプチドワクチンによって免疫された動物で、ウイルス接種後に誘導される感染細胞排除のエフェクター機構を解析した。その結果、ペプチド免疫マウス・非免疫マウスとも、ウイルス感染後にCD8陽性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)活性が誘導されること、ペプチドワクチン投与群でのみCD4陽性CTLも誘導されること、しかし感染初期のエフェクター機構の主体を成すのはナチュラルキラー(NK)細胞であることが明らかとなった。ペプチドワクチン投与マウスからT細胞機能を保ったままNK細胞を除去すると、ワクチンによる感染防御効果が完全に失われた。

### A. 研究目的

ウイルス感染に対する防御ワクチンとして、理論的にも実際上最も有効性が高いのは弱毒生ワクチンである。しかるにHIV感染の場合は、ウイルスそのものの病原性発揮メカニズムが完全に明らかにされたとは言えず、遺伝子改変によって作製された弱毒株候補についても、サルモデル実験で病原性のrevertant出現が報告されるなど、その安全性が証明されたとは言い難い。一方、感染者体内におけるHIVの急速な抗原変異が、安全かつ有効なサブユニット或いはペプチドワクチンの開発を困難なものとしている。実際、単一または少数のウイルス中和抗体エピトープ或いは細胞傷害性Tリンパ球(CTL)認識抗原エピ

トープを用いたワクチン療法は、却って変異株の出現と病態の進行を早めたとの報告がある。一方で、HIV抗原特異的なTh1タイプのCD4陽性Tリンパ球の反応性が、ハイリスクグループでの感染阻止や感染者における良好な予後と相関すると言われている。

フレンド白血病レトロウイルス複合体(FV)は、免疫系の完成した成熟マウスへの接種により重篤な免疫不全症を伴う致死性の赤白血病を誘発する。FVは静脈内接種で感染し、感受性マウスは極微量のウイルス接種で確実に死に至るほか、感染マウスから性行為を介して伝搬することも証明されており、ヒトレトロウイルス感染に対する宿主免疫応答解析の有効なモデルとなりうる。

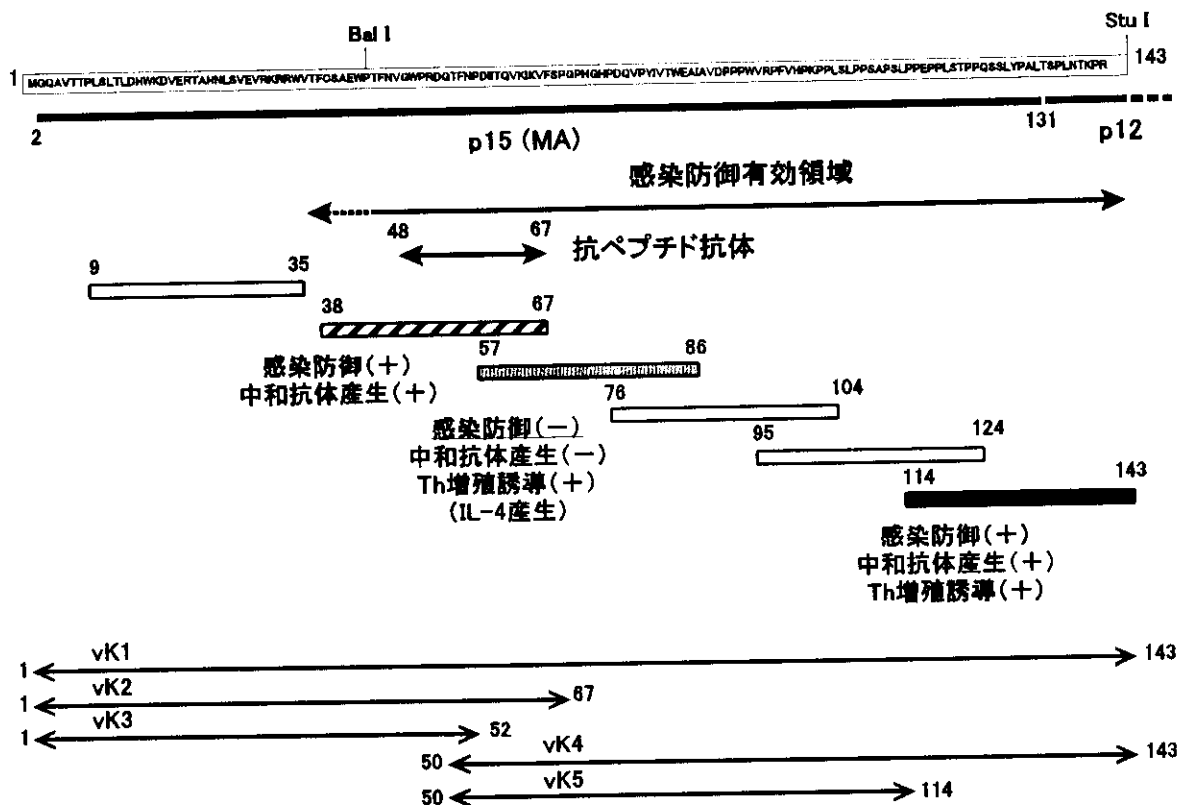


図 1. フレンド白血病レトロウイルス gag 遺伝子産物上の感染防御エピトープの解析

我々はFVを用いた実験で、env 遺伝子産物上のCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが、それ単独でレトロウイルス感染阻止に有効に働くことを示して来た。本研究班では、株間変異の少ない gag 遺伝子産物上に感染防御に有効な抗原構造を同定し、その作用機序を明らかにすることを目標としている。本年度は、gag 遺伝子産物上の感染防御エピトープ同定計画の進行状況と、env 遺伝子産物上のCD4陽性T細胞認識エピトープで免疫された動物で、ウイルス感染後に誘導されるエフェクター機構の解析結果とを報告する。

## B. 研究方法

我々がFVのgag 遺伝子産物上に存在を示した感染防御エピトープ (Miyazawa, M. et al. *J.*

*Virol.* 66: 4497-4507, 1992) の存在部位を限定し、同じくgag 遺伝子産物上に別に同定した細胞傷害性Tリンパ球認識エピトープ (Kondo, T. et al. *J. Virol.* 69:6735-41, 1995) との異同を明らかにするため、感染防御エピトープが存在すると考えられるMA蛋白質コード範囲内の、更に短い遺伝子断片を発現する組換えワクシニアウイルスを作成した。また、これらのミニ遺伝子の発現を確認する目的で、MA蛋白質内で抗原性が高いと考えられる部分に対応する合成ペプチドを作成し、ウサギを免疫して抗血清を作成した。

一方、env 遺伝子産物上のCD4陽性T細胞認識エピトープを単独で含む合成ペプチド (HPPSYVYSQFEKSYRHKR: 以下ペプチド i) で、FV感染に対して感受性の極めて高い



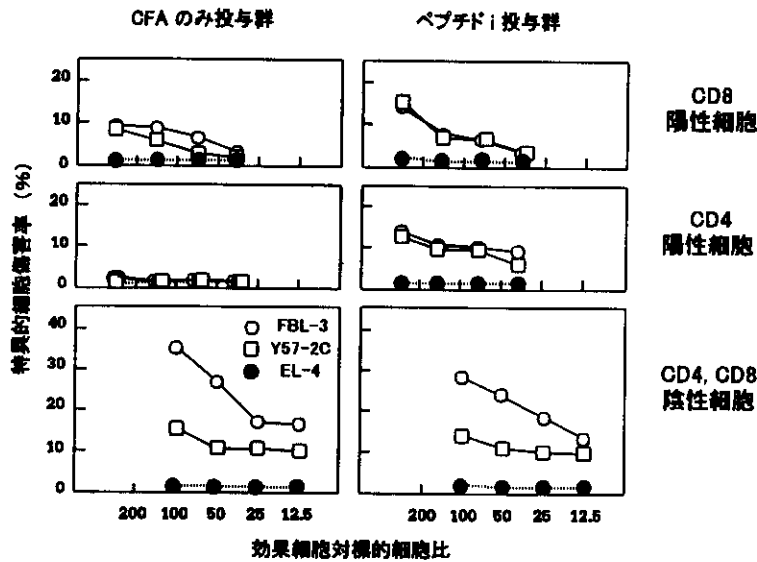


図 2. ペプチドワクチン免疫群及び非免疫群CB6F<sub>1</sub>マウスにおけるFV接種後の細胞傷害性エフェクター細胞の解析。

(BALB/c × C57BL/6)F<sub>1</sub> (CB6F<sub>1</sub>) マウスを一回だけ免疫した。免疫マウスにFVを感染後、経時的に脾細胞を採取し、ここから磁気細胞分離装置によりCD4陽性、CD8陽性、CD4、CD8ともに陰性、或いはDX5陽性の細胞群を純粋分離した。これらの細胞群を効果細胞とし、複数のフレンド白血病細胞株或いはNK感受性のYAC-1細胞株を標的細胞として、試験管内で<sup>51</sup>Cr放出法による細胞傷害試験を行った。

その他、細胞表面マーカーのフローサイトメトリーによる解析、ペプチド刺激によるT細胞増殖試験等は、通常の方法に従って実施した。

### C. 研究結果

#### 1) gag遺伝子産物上の感染防御エピトープの解析

FVのgag遺伝子5'-末端(細胞表面型gag蛋白質のリーダー配列を含む)からp15(MA)蛋白質全長までを発現する組換えワクシニアウ

イルスには感染防御能があり、p15のN-末端小断片のみを発現する組換えワクシニアウイルス、及び我々が細胞表面型 glycosylated gag蛋白質リーダーペプチド内に同定したCTL エピトープのみを発現する組換えワクシニアウイルスには感染防御能がないことが既に明らかとなっている。

上記実験で同定された gag遺伝子断片内を、オーバーラップする30-merの合

成ペプチドでカバーし、マウスを免疫して感染防御実験及び試験管内のT細胞活性化試験を行ったところ、38-67と114-143にFVに対する感染防御活性を認めた(図1)。また、感染防御能の無い57-86と感染防御性の114-143にはCD4陽性T細胞増殖誘導能があり、57-86はIL-4産生を誘導した。更に、感染防御性のペプチド(38-67, 114-143)でCB6F<sub>1</sub>マウスを免疫すると、ウイルス接種後IgGクラスの中和抗体が産生された。

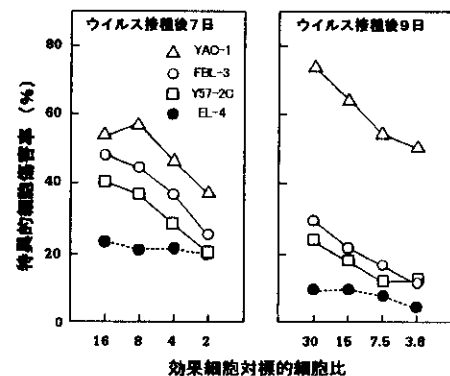


図 3. B220陰性、DX5陽性細胞画分の細胞傷害活性

更に短い合成ペプチドを用いて感染防御エピトープを同定することを試みたが、小断片ペプチドによる感染防御効果に互いに矛盾する結果が得られ、エピトープの同定には至らなかった。そこで、図1に示すgag遺伝子の小断片を発現する組換えワクシニアウイルスを作成し、再度遺伝子断片のレベルで感染防御エピトープ存在部位を限定することを試みている。

なお、この過程で遺伝子断片の発現確認用に作成した合成ペプチド(48-67)が、確かに抗体産生を誘導することが示唆され、最もN-末側の合成ペプチド(38-67)による感染防御は抗体産生の誘導によるものである可能性が考えられた。

## 2) CD4陽性T細胞認識エピトープを単独で含むペプチドワクチンによる感染防御のエフェクター機構

FVのenv遺伝子産物上に我々が同定したCD4陽性T細胞認識エピトープを単独で含む合成ペプチドiで免疫されたCB6F<sub>1</sub>マウスは、FV感染に対して強い抵抗性を示し、FV接種後10日以内に、体内からウイルス感染細胞がほぼ完全に排除される。そこで、CD4陽性T細胞を感作したマウスでFV接種後に誘導されるエフェクター機構をin vitroで解析した。

ウイルス感染細胞の急速な排除が起こるウイルス接種7~9日目に脾細胞中のエフェクター細胞を細胞表面マーカーによって分離すると、ペプチド免疫マウス、非免疫マウスの何れに於いても、CD8陽性CTL活性が検出され、ペプチド免疫マウスではCD4陽性CTL活性も検出された(図2)。意外なことに、ペプチ

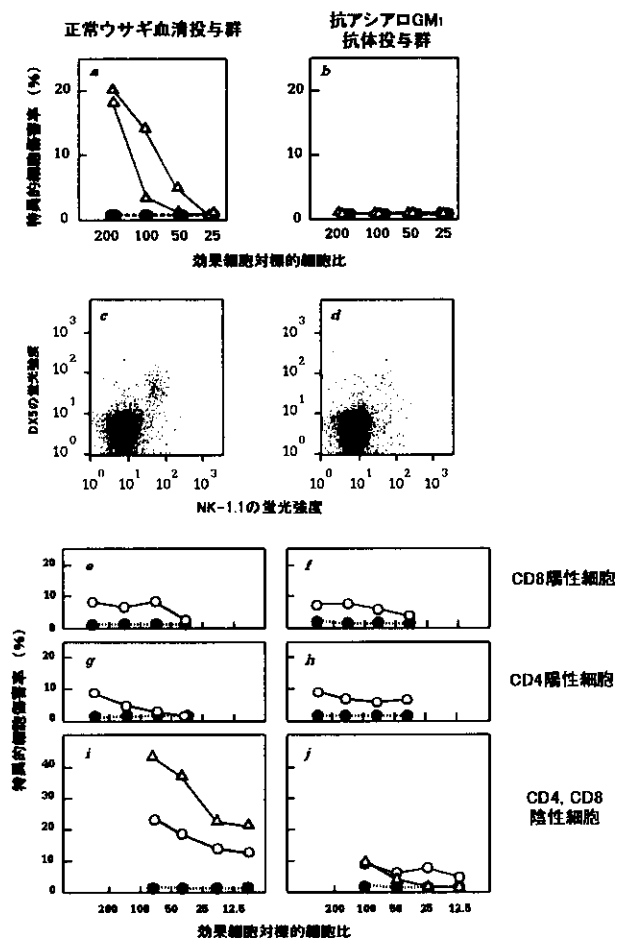


図4. 抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体投与によるNK活性の除去と、CD4/CD8 double-negative分画によるフレンド白血病細胞傷害活性への影響。a, b: B220陰性細胞分画のNK細胞活性。c, d: フローサイトメトリーによるNK細胞除去の確認。e-j: 脾細胞中のCD4陽性分画、CD8陽性分画、CD4/CD8 double-negative分画による細胞傷害活性。標的細胞は△, YAC-1; ○, フレンド白血病細胞株FBL-3; ●, EL-4。

ド免疫マウス、非免疫マウスの何れに於いても、フレンド白血病細胞株に対して最も強い細胞傷害効果を示すのはCD4, CD8がともに陰性の細胞分画であった。そこで、上記CD4/CD8 double-negative分画の実体を明らかにするため、脾細胞中のB220陰性分画からNK細胞マーカーであるDX5の陽性細胞を分離すると、この細胞分画は低い標的細胞対効果細胞比でフレンド白血病細胞株に対する傷害活性を

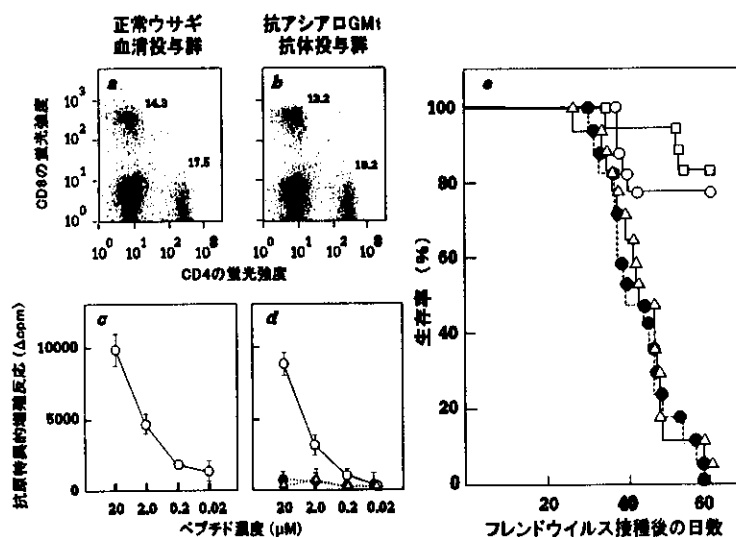


図 5. ペプチドワクチン免疫マウスに於ける抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体の投与効果。a, b: 脾細胞のフローサイトメトリー解析。c, d: CD4陽性T細胞のペプチド特異的増殖反応。○はペプチド iによる刺激、●と△は陰性対照ペプチドによる刺激。e: ペプチド免疫マウス(白抜きシンボル)または無免疫対照マウス(●)のFV接種後の生存曲線。○は抗体投与無し、□は正常ウサギ血清投与群、△は抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体投与群。

示した(図3)。

次に、ペプチドワクチンの感染防御効果におけるNK細胞の役割を明らかにするため、抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体を用いて生体内でNK細胞を除去する実験を行った。予めペプチド iで免疫したCB6F<sub>1</sub>マウスに、FV接種の前後抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体を繰り返し投与すると、脾細胞中のYAC-1細胞傷害活性が完全に失われ、NK細胞マーカーを有する細胞も殆ど検出できなくなった。この際CD8及びCD4陽性CTLによるフレンド白血病細胞傷害活性は保たれたが、CD4/CD8 double-negative分画の細胞傷害活性はほぼ完全に失われた。一方、陰性対照のウサギ血清を投与した群では、CD4/CD8 double-negative分画の細胞傷害活性は保たれていた(図4)。

また、抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体の投与は脾細胞中のCD4及びCD8陽性T細胞数には有意な

影響を与えず、iペプチド特異的なCD4陽性T細胞の増殖反応も障害されることはなかった。しかるに、抗アシアロGM<sub>1</sub>抗体投与マウスでは、ペプチドワクチンによる感染防御効果が完全に失われた(図5)。

#### D. 考察

HIV感染に対する防御ワクチンの開発には、これまでウイルス中和抗体やCD8陽性CTLの誘導が最も重要と考えられてきた。しかしながら、サルを用いた実験的研究やエイズ患者へのCTL移入実験では、ペプチドワクチンによるCTLや中和抗体の誘導が感染防御に有効でないばかりか、抗体が

感染を促進したり、CTLの移入がエスケープ変異体の選択を促進したとの報告が目立つ。一方、我々はフレンド白血病レトロウイルス *env* 遺伝子産物上にCD4陽性T細胞認識エпитープを同定し、これを単独で含むペプチドワクチンが感染マウスの体内で複数のエフェクター機構を誘導することにより、早期のウイルス感染細胞排除に導くことを報告してきた。

今年度の研究結果は、ペプチドワクチン免疫マウスに於けるウイルス感染細胞排除のエフェクター機構として、感染初期のNK細胞活性が重要な役割を果たすことを示している。同様なレトロウイルス感染初期のNK細胞活性化は、ごく最近サルを用いたSIV感染の系でも報告されており、複数個体間のウイルス感染価とNK細胞活性の比較から、感染1~2週間目のNK細胞活性が初期のウイルス排除に重要な役割を果たすことが示唆されている。

我々は更に一步進んで、ペプチドワクチン免疫マウスからNK細胞を除去することにより、ワクチンによる感染防御効果が完全に失われることを示した。

ウイルス感染初期のNK細胞活性化は、非免疫マウスでも観察されているため、ペプチドワクチン投与によるCD4陽性Tリンパ球感作の直接の効果とは考え難く、むしろレトロウイルス感染そのものの結果と考えられる。それにも拘わらず、Tリンパ球の数や機能に直接影響を与えずにNK細胞のみを除去することでペプチドワクチンによる感染防御効果が完全に失われたことから、NK細胞が他のエフェクター機能と強調することがワクチン誘発感染防御反応に必須であることがわかる。

NK細胞と協調して働く他のエフェクター機構としては、これまで我々がその必要性を明らかにして来たCD8陽性CTLとウイルス中和抗体の他、今回新たに明らかになったCD4陽性CTLが重要であるかも知れない。

我々は以前から、フレンドウイルスgag遺伝子産物N-末のMA蛋白質内に複数の感染防御エピトープ及びCD4陽性Tリンパ球認識エピトープが存在することを示してきた。興味深いことに、これまでにその存在部位を限定した感染防御エピトープは、我々が以前に同定したCTL認識エピトープとは異なっている。

MA蛋白質中に複数存在する感染防御エピトープは、いまだにその構造が同定出来ておらず、今後の重要な研究課題である。今回、感染防御性エピトープの一つを含むN-末側の38-67の領域には、抗体により認識される構造が含まれていることが示唆された。以前からHIVのMA蛋白質であるp17に対する抗体が

ウイルス中和能を示すとの報告があり、上記38-67のペプチドで免疫された動物がFV感染後に中和抗体産生を示したことと共に、極めて興味深い。

今後gag遺伝子産物上の複数の感染防御エピトープの構造を同定し、それらとウイルス中和抗体或いはCD4陽性Tリンパ球認識エピトープとの関係を明らかにすることで、HIV gag抗原を用いた感染防御ワクチン開発に有用な情報を提供していきたいと考えている。

## E. 結論

マウスレトロウイルスMA蛋白質内には、複数の感染防御性エピトープと、CD4陽性Tリンパ球認識エピトープ、及び恐らくウイルス中和抗体の認識するエピトープがある。

env遺伝子産物上のCD4陽性T細胞認識エピトープを用いた感染防御免疫の誘導には、ウイルス感染初期のNK細胞活性化が必須である。NK細胞は、恐らくウイルス感染後に誘導される他のエフェクター機構と協調することで、ウイルス感染細胞の早期排除に寄与するものと考えられる。ペプチドワクチン投与マウスにのみ認められるエフェクター機能として、CD4陽性細胞傷害性T細胞が見出された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Miyazawa M., N. Tabata, R. Fujisawa, K. Hashimoto, H. Shiwaku, and Y. A. Takei. Roles of endogenous retroviruses and platelets in the development of vascular injury in spontaneous mouse models of autoimmune diseases. *Int. J. Cardiol.* 75:S65-73, 2000.