

ることが可能であることを確認しており、今後これらの手法を用いることにより、より多くのエピトープを認識するワクチンの開発が可能と考えられる。

#### E. 結論

HEV の VLP に HIVenv DNA ワクチンを封入し、経口 DNA ワクチン開発の基礎的検討を行った。HIVenv DNA ワクチン封入 VLP 経口投与で HIV 特異的免疫反応を誘導した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Uno-Furuta, S., Tamaki, S., Takebe, Y., Takamura, S., Kamei, A., Kim, G., Kuromatsu, I., Kaito, M., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by *in vivo* electric administration of peptides. *Vaccine* 2001; 19: 2190-2196.
- 2) Iwanami, N., Niwa, A., Yasutomi, Y., Tabata, N., and Miyazawa, M. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Virol.* 2001; 75: 3152-3163.
- 3) Mori, K., Yasutomi, Y., Ohgimoto, S., Nakasone, T., Takamura, S., Shioda, T. and Nagai, Y. Quintuple deglycosylated mutant of simian immunodeficiency virus SIVmac239 in rhesus macaques: Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild-type strain. *J. Virol.* 2001; 75: 4023-4028.
- 4) Kuromatsu, I., Matsuo, K., Takamura, S., Kim, G., Takebe, Y., Kawamura, J. and Yasutomi, Y. Induction of effective antitumor immune responses by using DNA of an  $\alpha$  Ag from mycobacteria. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8: 483-490.
- 5) Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Tian-Cheng Li, Takeda, N. and Yasutomi, Y. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology* in press

6) Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yasutomi, Y., Maki, S., Tsuchiya, T., Noda, N., Toyozaki, T., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Sakakura, T. and Yoshida, T. Tenascin-C is a Useful Marker for Disease Activity in Myocarditis. *J. Pathol.* in press

7) Uno-Furuta, S., Matsuo, K., Kim, G., Tamaki, S., Takamura, S., Kamei, A., Kuromatsu, I., Kaito, M., Matsuura, Y., Miyamura, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. Immunization with recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. submitted

8) Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Fujita, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H. HER2 peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. submitted

##### 2. 学会発表

1) リコンビナント E 型肝炎ウイルス様中空粒子を用いた HIV 経口ワクチンの開発: 高村史記、新倉昌浩、武田直和、宮村達男、保富康宏・・・第 15 回日本エイズ学会学術集会 (東京)

2) 糖鎖欠失 SIV( $\Delta$ 5G) 感染アカゲザルの感染防御に關与するウイルス特異的 CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞の解析: 杉本知恵、保富康宏、斎藤紀子、扇本真治、永井美之、森一秦・・・第 15 回日本エイズ学会学術集会 (京都)

3) 新規 RT inhibitor (GW420867) を用いた感染後早期治療動物モデルの開発と免疫機能の解析: 齋藤紀子、保富康宏、杉本知恵、洲鎌一成、Francois Villinger、Afrabi Ansari、山崎修道、森一秦・・・第 15 回日本エイズ学会学術集会 (東京)

4) サブタイプ E HIV に対する DNA ワクチンの開発とサブタイプ B HIV に対する交差反応性の検討: 松原明弘、伊藤優子、武部豊、草川茂、高村史記、保富康宏・・・第 15 回日本エイズ学会学術集会 (東京)

5) 糖鎖変異 env による感染防御免疫誘導能の検討: 森一秦、保富康宏、扇本真治、武部豊、

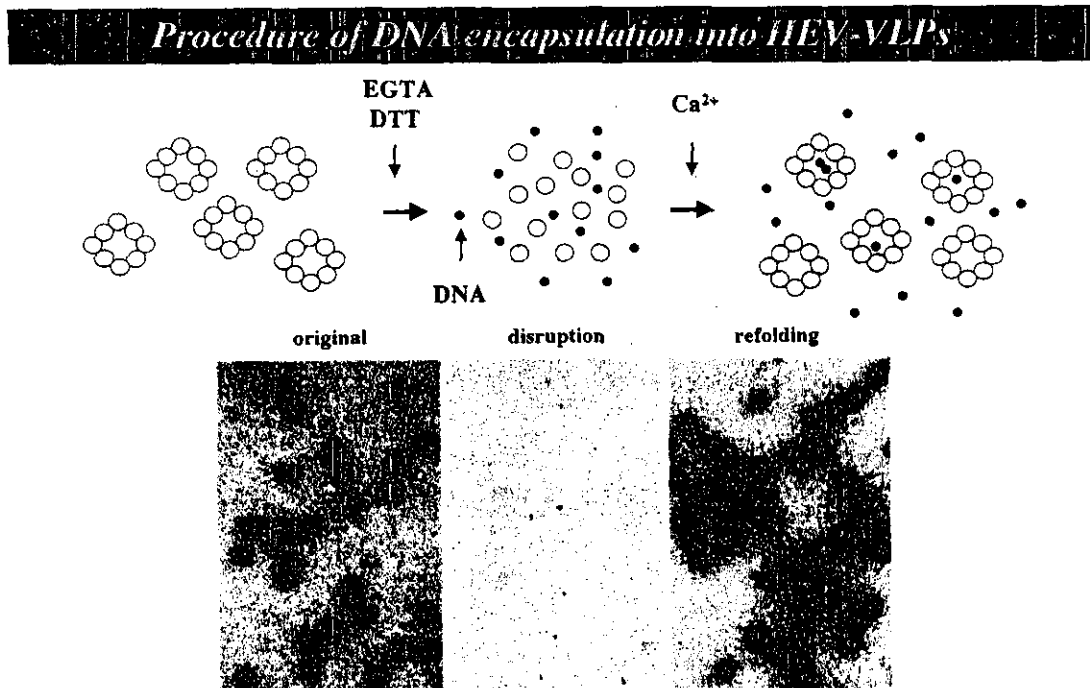


Fig. 1

HEV-VLP を溶液中の  $Ca^{2+}$  をキレートすることで一端解離させ、DNA 添加後再び  $Ca^{2+}$  を加え粒子を再構築することで DNA を VLP 内に封入した。

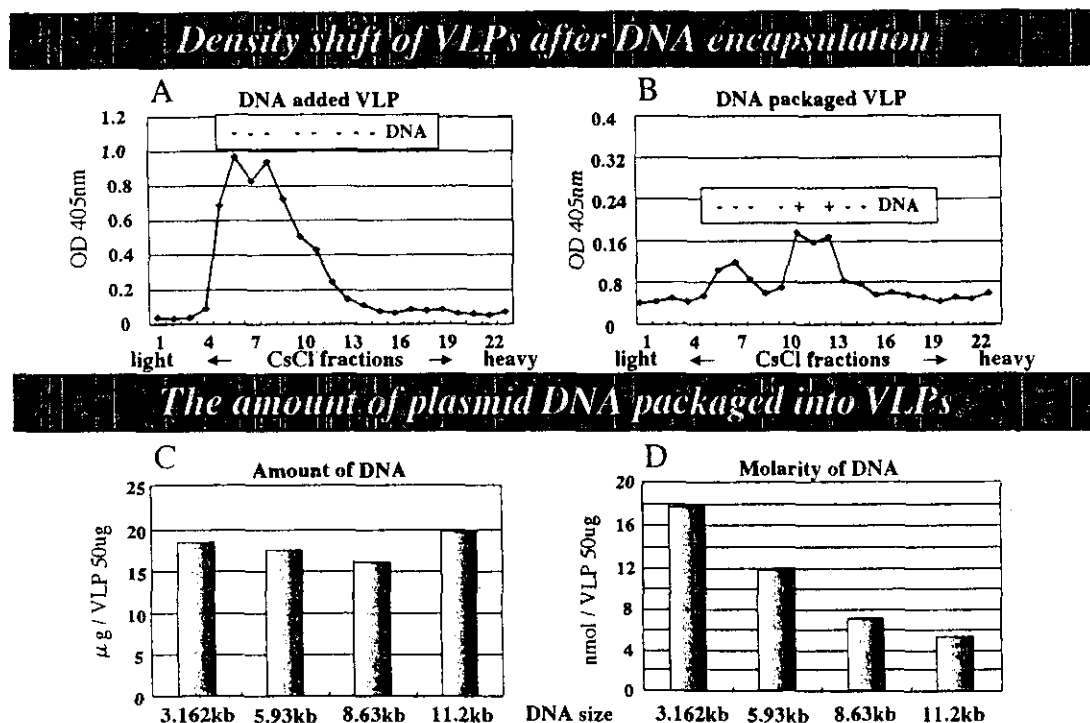


Fig. 2

上記の方法により DNA 封入 VLP の CsCl 超遠心後の fraction はやや重い方にシフトした。また VLP に封入される DNA 量 ( $\mu g$ ) は DNA サイズに関係なくほぼ一定であったが、mol 数においては DNA サイズが小さい方が多く封入された。

*Cre-mediated activation of LacZ gene in loxP-CAT-loxP-LacZ transgenic mouse immunized with Cre gene packaged HEV-VLP*

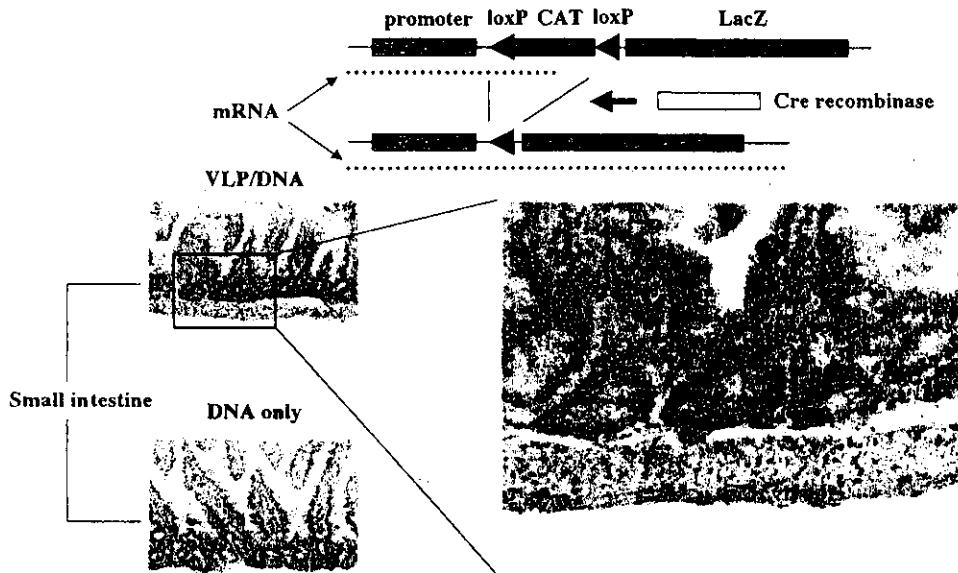


Fig. 3

Cre recombinase 発現 DNA を VLP に封入し、これを loxP 下流に LacZ をもつトランスジェニックマウスに経口投与したところ、小腸上皮細胞において封入 DNA の発現を試みた。

*Induction of mucosal and systemic anti-HIV humoral immune response by oral administration of VLP/DNA*

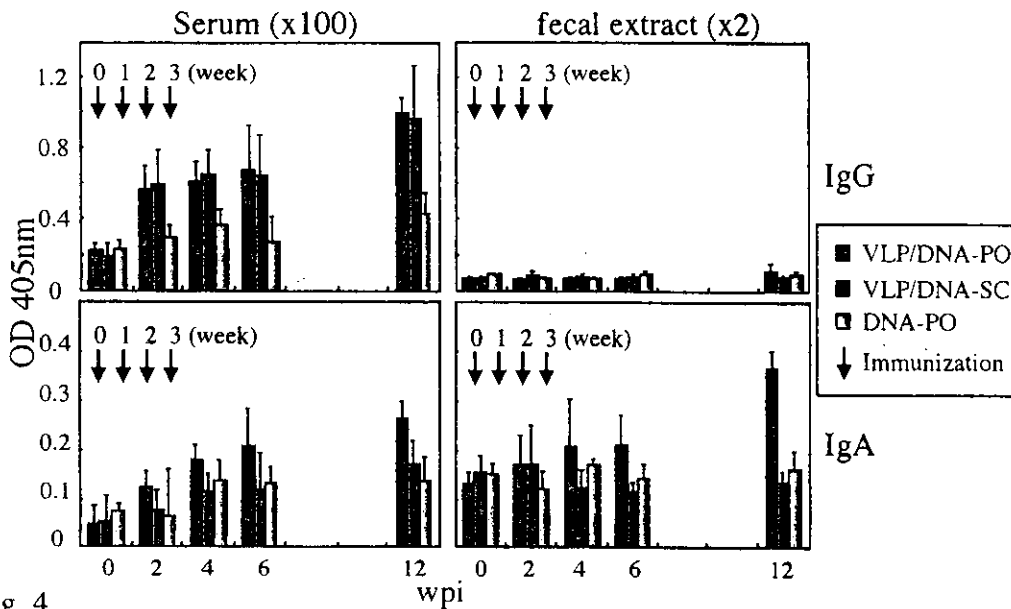


Fig. 4

HIVenv DNA を封入した VLP をマウスの経口より 1 週間隔で 4 回投与し、免疫後の HIVenv に対する抗体を検索した。この結果血清、および腸管内容液よりエピトープ特異抗体が検出され、腸管内容液においてウイルスの中和に重要と考えられている IgA の誘導も確認された。

**Induction of the mucosal and systemic anti-HIV CTL responses by oral immunization with VLP/DNA**

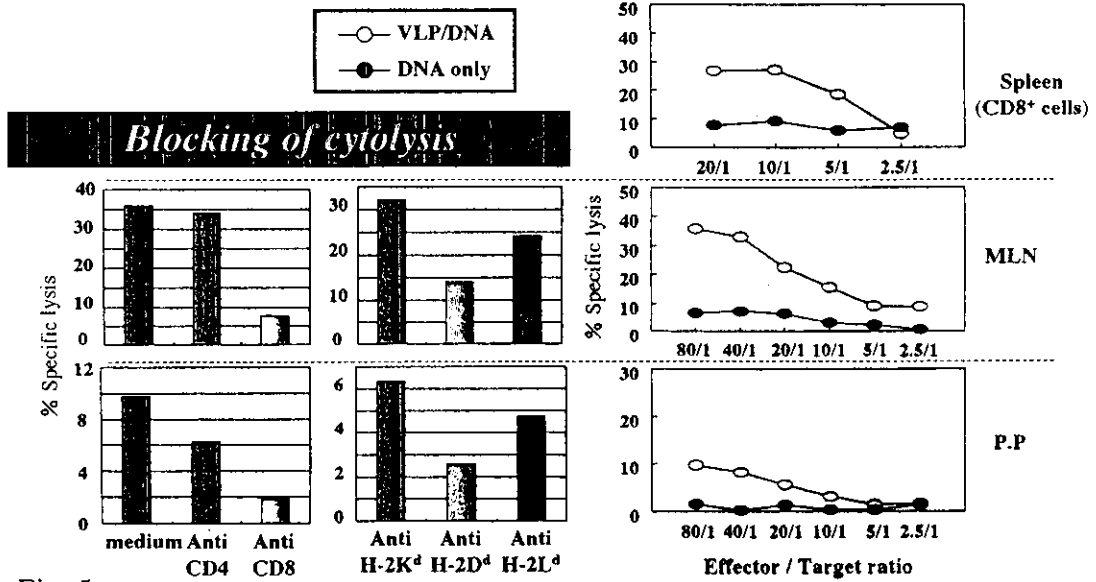


Fig. 5

同様に免疫後のマウスにおける HIVenv 特異的細胞障害活性を測定したところ、脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板においてその活性が得られた。またこれらは CD8<sup>+</sup>、MHC classI 拘束性であることも確認された。

## HIV-1 特異的 CD8 T 細胞による HIV-1 感染細胞の認識

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：我々は、ヒトの HIV-1 特異的 CD8 T 細胞による HIV-1 感染細胞の認識を研究するために、これらの CD8 T 細胞が認識する HIV-1 エピトープの同定してきた。本年度はさらに、HLA-A\*3303 によって提示される HIV-1 サブタイプ B の 2 つの Env 蛋白、3 つの Pol 蛋白及び 1 つの Gag 蛋白由来のエピトープの同定に成功した。さらに HIV-1 感染細胞上の HIV-1 エピトープの認識を、CD8 T 細胞がどのようにおこなうかを解析した。その結果、HIV-1 に感染した末梢血 CD4 陽性 T 細胞では、Nef 蛋白によって細胞表面への HLA-A 及び HLA-B 抗原の移行が障害され、その結果 T 細胞への抗原提示がされない事、すなわち特異的 CTL に殺されない事が確認できた。しかし HIV-1 に感染した末梢血 CD4 陽性 T 細胞の刺激により、HIV-1 特異的 CTL クローンのサイトカイン産生が確認できた。また、HIV-1 に感染した末梢血 CD4 陽性 T 細胞と HIV-1 特異的 CTL クローンとの共培養により、HIV-1 の増殖の部分的抑制が見られた事から、HIV-1 特異的 CTL から産生されるサイトカインが HIV-1 の増殖の部分的抑制に関与していると考えられた。

### A. 研究目的

我々は、今までに HIV-1 感染者の免疫病態の解析や HIV-1 ワクチンの作製に必須である HIV-1 エピトープを同定してきた。今回さらに HLA-A\*3303 によって提示される HIV-1 サブタイプ B の同定をおこなった。また、CTL の HIV-1 感染細胞の認識機序および HIV-1 の CTL からの逃避機序を研究するために、Nef 欠損 HIV-1、Nef mutant HIV-1 を用いて、HIV-1 感染細胞に対する細胞傷害活性、サイトカイン産生能及び HIV-1 増殖抑制能を調べた。これによって、Nef による HLA クラス I 分子の downregulation が CTL の抗原認識に及ぼす影響を明らかにし、HIV-1 の CTL からの逃避機構を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) HLA-A\*3303 結合 HIV-1 ペプチドの選択

HLA-A\*3303 結合ペプチドモチーフ（2 番目が Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, で C 末端は Arg）に一致する 181 個の HIV-1SF2 由来

の 8-mer から 11-mer のペプチドを選択する。

これらのシーケンスを持ったペプチドを合成して、RMA-S-A\*3303 細胞を用いたアゼンブリング法でその結合を調べた。

#### 2) 特異的 CTL の誘導と CTL クローンの作製

HLA-A\*3303 に結合したペプチドを、HLA-A\*3303 を持った HIV-1 慢性患者の末梢血リンパ球を刺激して、ペプチド特異的 CTL を誘導する。さらに特異的 CTL が誘導できたペプチドに対して CTL クローンを作製する。

#### 3) エピトープの同定

CTL クローンを用いて、HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べる。

#### 4) HIV-1 感染細胞の作製

NL-432、NL-432 の Nef 欠損株である NL-Xh、NL-432 の Nef 蛋白の 2 0 番目のアミノ酸を置換した NL-M20A の 3 種類のウイルスを、

HLA-A24,B35 を持った人の末梢血リンパ球から分離培養した CD4T 細胞に感染させた。感染後、フローサイトメトリーで p24 と HLA クラス I 抗原の発現を測定した。

#### 5) CTL クローンのサイトカイン産生の測定

HIV-1 感染細胞を刺激細胞として用いて HIV-1 特異的 CTL クローンを刺激し、そのサイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ )産生能を、6 時間後に抗サイトカイン抗体を用いて細胞内染色して測定した。

#### 6) CTL クローンによる HIV-1 増殖抑制

NL-432 あるいは NL-M20A を感染させた CD4T 細胞と HIV-1 特異的 T 細胞を共培養して、CD4T 細胞の p24 の発現をフローサイトメトリーを用いて、また培養上製の p24 量を EIA で測定した。さらに、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞の数をフローサイトメトリーを用いて測定した。

#### (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) HLA-A\*3303 拘束性 HIV-1 CTL エピトープの同定

HLA-A\*3303 結合ペプチドモチーフに一致する 181 個の HIV-1 ペプチドの HLA-A\*3303 への結合を調べた結果、89 ペプチドが結合した。これらの HLA-A\*3303 結合ペプチドを用いて、HLA-A\*3303 を持った HIV-1 慢性感染者の末梢血リンパ球を刺激して、特異的 CTL の誘導を試みた所、8 つのペプチドによってペプチド特異的 CTL の誘導が見られた。さらにこれらの 8 つのペプチドに対する特異的 CTL クロ

ーンを作製して、これを用いて HIV-1 リコンビナントワクチニアウイルスに感染した細胞の傷害活性を調べた所、3 つの Pol 蛋白由来、1 つの Gag 蛋白由来と 2 つの Env 蛋白由来のペプチドに対する CTL クローンは、特異的な細胞傷害活性を示した。このことからこれら 6 つのペプチドは、HLA-A\*3303 によって提示される CTL エピトープであると考えられた。

#### 2) Nef による HLA-A,B 抗原の downregulation が HIV-1 特異的 CTL の細胞傷害活性に及ぼす影響

NL-432、NL-432 の Nef 欠損株である NL-Xh、NL-432 の Nef 蛋白の 20 番目のアミノ酸を置換した NL-M20A をそれぞれ感染させた CD4T 細胞を、感染後に時間経過を追って HLA クラス I 抗原の細胞表面の発現をフローサイトメトリーで調べた。その結果、NL-432 を感染させた細胞では、HLA クラス I 抗原の細胞表面の発現が低下したが、一方 NL-Xh および NL-M20A を感染させた細胞では、HLA クラス I 抗原の細胞表面の発現が低下が見られた。これらの細胞に対する HIV-1 特異的 T 細胞クローンの細胞傷害活性を調べたところ、NL-432 を感染させた細胞に対しては細胞傷害活性が見られなかったが、一方 NL-Xh および NL-M20A を感染させた細胞に対しては見られた(図 1)。これらの結果から、Nef による HLA クラス I の downregulation によって、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞の細胞傷害活性が著しい影響を受けることが明らかになった。

#### 3) Nef による HLA-A,B 抗原の downregulation が HIV-1 特異的 CTL のサイトカイン産生に及ぼす影響

NL-432 および NL-M20A を感染させた細胞が、HIV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞のサイトカイン産生を誘導できるかを調べた。その結果 NL-M20A を感染させた細胞で刺激した場合の方が 3 種類のサイトカイン産生が多く見られた

が、NL-432 を感染させた細胞で刺激した場合でも十分なサイトカイン産生が見られた(図2)。

4) NefによるHLA-A,B抗原のdownregulationがHIV-1の増殖に及ぼす影響

NL-432 あるいは NL-M20A を感染させたCD4T細胞とCTLクローンを共培養して、HIV-1特異的CTLクローンによるHIV-1の増殖抑制を調べた。その結果、NL-M20Aを感染させたCD4T細胞とHIV-1特異的CTLクローンを共培養したものは、HIV-1の増殖は完全に抑制された。一方、NL-432を感染させたCD4T細胞とHIV-1特異的CTLクローンを共培養したものは、HIV-1の部分的な増殖抑制が見られた(図3)。このことから、CTLクローンからのサイトカインによってHIV-1の増殖が部分的に抑制されたと考えられた。

D. 考察

NefによるHLA-A,B抗原のdownregulationによって、CTLの細胞障害活性が見られなくなる事が報告されている。今回の我々の研究においても、HLA-A,B抗原のdownregulationを起こさないmutant Nefを用いた実験においてもこのことは確認された。しかしながら、HIV-1特異的CTLクローンのサイトカイン産性能に与える影響はそれほど強くなく、NefによるHLA-A,B抗原のdownregulationがおきても十分量のサイトカイン産生が起こる事が確認できた。さらに、NL-432感染させたCD4T細胞とCTLクローンを共培養して、HIV-1特異的CTLクローンによるHIV-1の増殖抑制を調べた実験から、NL-432感染させたCD4T細胞から抗原提示されたエピトープを認識したHIV-1特異的CTLクローンから産生されたサイトカインによって、部分的なHIV-1の増殖抑制がおきることが明らかになった。これらの事は、HIV-1慢性感染の患者ではCTLによる部分的なHIV-1の増殖抑制がおきている事を説

明している。

本研究によって、HLA-A,B抗原のdownregulationがおきても十分量のサイトカイン産生が起こる事が初めて証明できた。

E. 結論

- 1) 新たに6種類のHLA-A\*3303拘束性CTLエピトープを同定できた。
- 2) Nef蛋白によるHLAクラスIの細胞表面からの発現低下によって、HIV-1特異的CTLのT細胞レセプターからのシグナルが低下し、細胞傷害活性の著しい障害、サイトカイン産生の部分的低下が見られた。しかし、低下したサイトカイン産生でも部分的なHIV-1増殖抑制が見られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui, M., Machida, S., Tomiyama, H., Takiguchi, M., Akatsuka, T.: Introduction of tapasin gene restores surface expression of HLA class I molecules, but not antigen presentation of an HIV envelope peptide in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285:508-517, 2001.
- 2) Mohammad S. Hossain., Tomiyama, H., Inagawa, Takabumi., Busarawan Sriwanthana., Oka, S., Takiguchi, M.: HLA-A\*3303-Restricted CTL Recognition for Novel Epitopes Derived from the Highly Variable Region of the HIV-1 Env Protein. *AIDS.* 15: 2199-2201, 2001.
- 3) Fukada, K., Tomiyama, H., Chantapong W., Matsuda, T., Kusagawa, S., Sato, H., Oka, S., Takebe, T., Takiguchi, M.: Cytotoxic T Cell Recognition of HIV-1 Cross-Clade and Clade-Specific Epitopes in HIV-1-infected

Thais and Japanese. AIDS. in press.

- 4) Fukada, H., Sobao, Y., Tomiyama, H., Oka, S., Takiguchi, M.: Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory and Effector CD8<sup>+</sup> T Cells. J.Immunol. in press.

## 2. 学会発表

- 1) Tomiyama, H., Oka, S., Takiguchi, M.: Functional discrepancy between two HIV-1-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells in individuals with chronic HIV-1 infection. Keystone Symposia (Keystone, Colorado, USA) March 29, 2001.

- 2) Tomiyama, H., Takiguchi, M.: Recognition of CD8<sup>+</sup> T cells for purified CD4<sup>+</sup>T cells infected with HIV-1: Effects of Nef-mediated HLA-class I downregulation. 2<sup>nd</sup> AIDS Seminar in Kumamoto. September 20-21, 2001.

- 3) Ueno, T., Tomiyama, H., Takiguchi, M.: A single T cell receptor-mediated recognition of an HIV-derived peptide in the context of multiple HLA molecules. 2<sup>nd</sup> AIDS seminar in Kumamoto. September 20-21, 2001.

- 4) Mohammad Sohrab Hossain, Tomiyama, H., Inagawa, T., Oka, S., Takiguchi, M.: Identification of HIV-1 CTL epitopes presented by HLA-A\*3303 molecules. 2<sup>nd</sup> AIDS seminar in Kumamoto. September 21-21, 2001.

- 5) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001) Nef 蛋白による HLA-ClassI 分子の発現低下が HIV-1 特異的 CTL の抗原認識に与える影響 (

液性因子産生能への影響) . 第49回日本ウイルス学会 (大阪) 平成13年11月18日~20日

- 6) Mohammad Sohrab Hossain、富山宏子、稲川卓文、岡慎一、滝口雅文 (2001) HLA-A\*3303 拘束性 HIV-1 CTL エピトープの同定. 第15回日本エイズ学会 (東京) 平成13年11月29日~12月1日

- 7) 富山宏子、松田智子、徳永美知代、滝口雅文 (2001) 抗原特異的 CD8 T 細胞の分化. 第31回日本免疫学会 (大阪) 平成13年12月11日~13日



図1 HIV-1感染CD4<sup>+</sup>T細胞に対する特異的CTLの細胞傷害活性

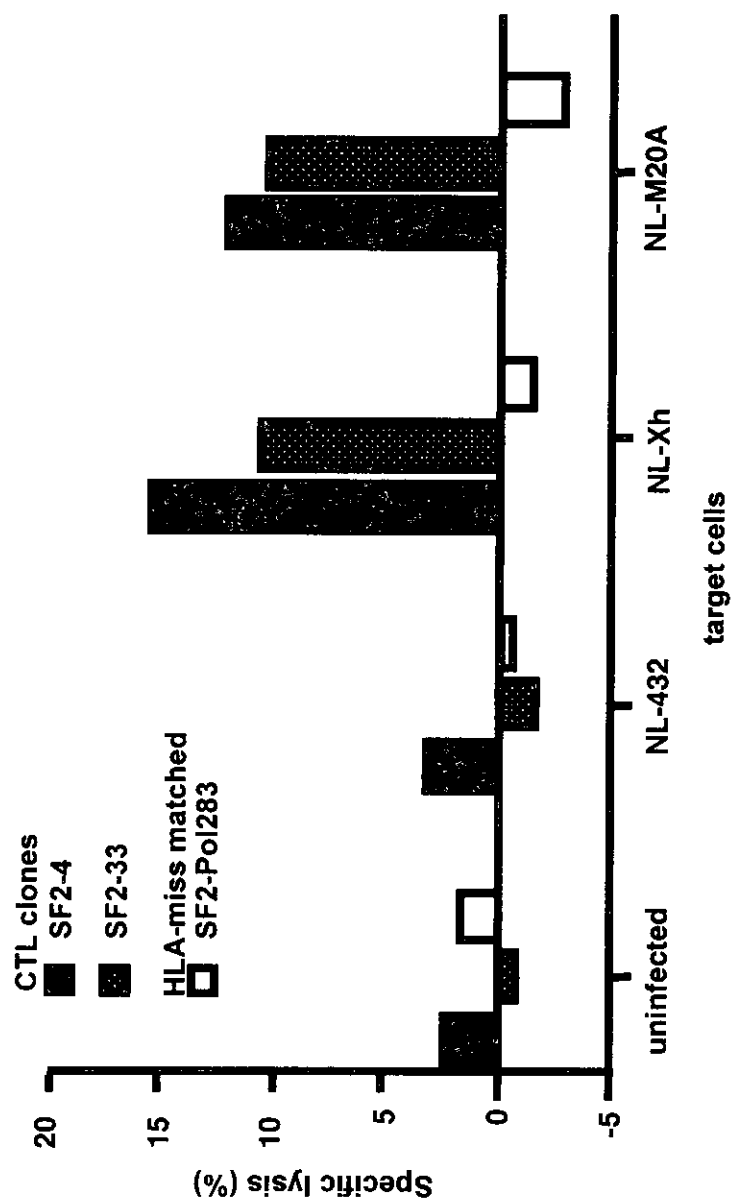


図2 HIV-1感染細胞の刺激によるCTL cloneのサイトカイン産生

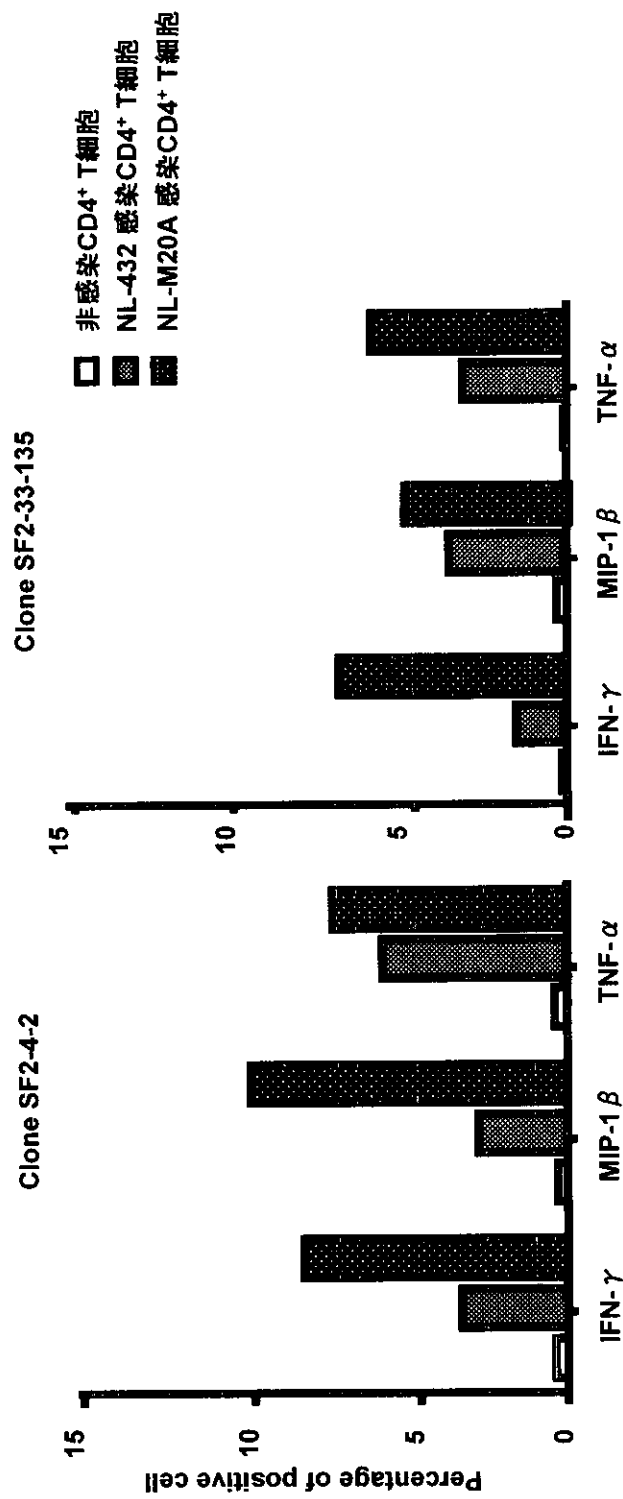
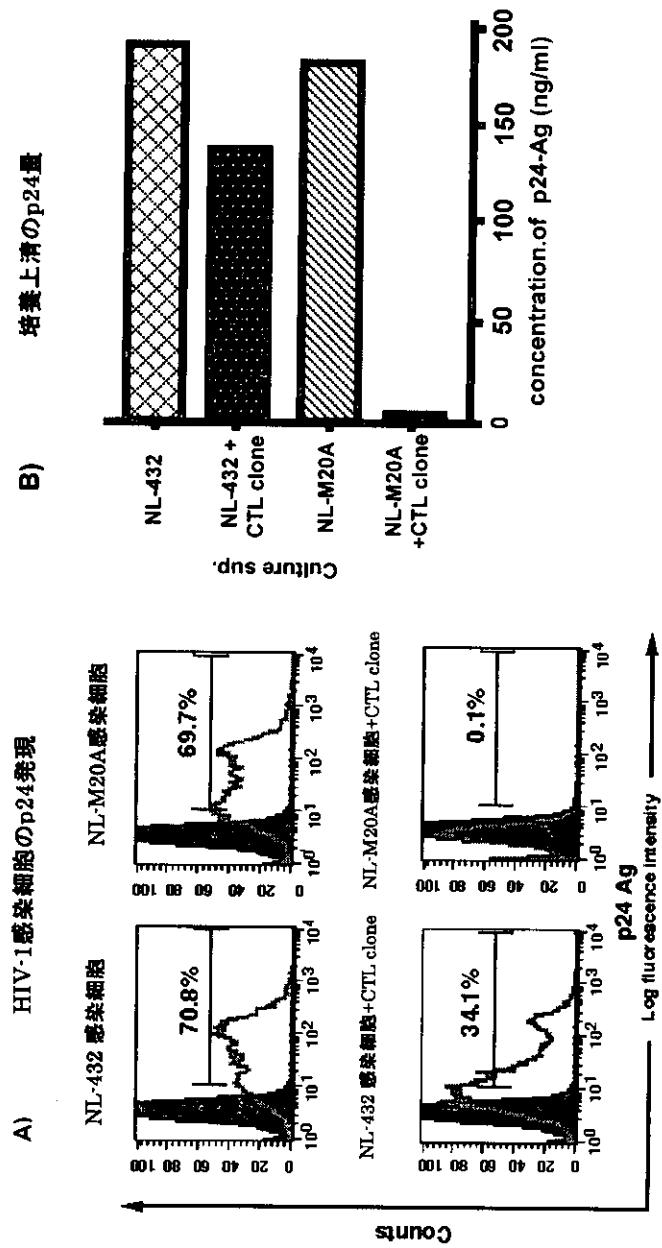


図3 特異的CTL cloneによるHIV-1の増殖抑制



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ケモカインレセプターを介した HIV 感染予防に関する研究

分担研究者 杉村 和久 鹿児島大学・教授、工学部生体工学科

研究協力者

伊東 祐二 鹿児島大学工学部生体工学科

橋口 周平 鹿児島大学工学部生体工学科

中島 敏博 (財)化学及血清療法研究所

研究要旨

HIV-1 の感染に CCR5 が重要な役割を果している。したがって HIV-1 と CCR5 の結合を阻害するエントリーインヒビターの開発は逆転写酵素阻害剤や HIV-1 特異的プロテアーゼ阻害剤の効果をさらに補強する意味で重要である。

本研究ではヒト一本鎖抗体を提示するファージディスプレイライブラリーを用いて CCR5 に特異的なヒト scFv の単離を 1) CCR5 陽性 293 細胞を用いた細胞パンニング法、および 2) CCR5 合成ペプチド、CCR5-L2 (168-178) を用いたプラスチックパンニング法により試みた。

A. 研究目的

私どもは 1998 年に受容体カリガンド結合部位の立体構造を認識する特異抗体で、かつその分子間の結合を阻害する活性をもつ抗体を用いると、ファージライブラリーから、受容体やリガンドの結合部位のコンホメーションをコピーしたモチーフを有するファージクローンを単離できることを明らかにした (1、2)。

この方法論では膜 7 回貫通型受容体、CCR5 のミミック分子を設計することも可能と考えられ、HIV-1 感染を阻害する抗 CCR5 抗体、2D7 を用いて CCR5 ミミックの設計を試みた。その結果ファージクローンのレベ

ルでは HIV-1 感染を阻害するクローン、M23, 2D7/m6 の単離を達成したが、そのモチーフの合成ペプチドでは、阻害活性が再現することができなかった (3、4)。この成果および HIV-1 感染を阻害するヒト scFv 抗体の作製は未だ達成されていない状況 (5) を踏まえ、新たにヒト抗体を提示するファージライブラリーを用いた HIV-1 エントリーインヒビターを開発する新しい研究を開始した。

この目的のために私どもは 20 名のヒト健康人の末梢血リンパ球を用いて、大規模な non-immune human single chain Fv (scFv) library を 4 種類 (V $\gamma$  と V $\lambda$ 、V $\gamma$  と V $\kappa$ 、V $\mu$

と V $\gamma$ 、V $\mu$ と V $\kappa$ ) 作製することを達成した (6)。このライブラリーは国際的にも優れて大規模なヒト抗体ライブラリーである。

## B. 研究方法

### 1. 抗体と合成ペプチド

マウス抗ヒト CCR5 モノクローナル抗体 (2D7: PharMingen)、ビオチン化マウス抗 M13 抗体 (Amersham-Pharmacia), Ultravidin-FITC (Leinco Technologies Inc) はそれぞれ購入した。CCR5 の細胞外第 2 ループの配列 168-178 を含む CCR5-L2 (biotin-GGCAGRSQKEGLHYTCS) を合成した。

### 2. ヒト一本鎖抗体提示 M13 ファージライブラリー (図 1)

20 名のヒト健常人から、それぞれ 50 ml の末梢血を採取し、Ficoll を用いて常法によりリンパ球を単離した。これらのリンパ球より ISOGEN (Nippon Gene) を用いて RNA を精製し、ヒト抗体  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$  鎖の定常部の配列を有する合成 DNA primer を用いて一本鎖 cDNA を作製した。この cDNA を鋳型にして、Markes らにより報告された各 V 遺伝子ファミリーの primer を用いて PCR にて遺伝子増幅を行った (7)。Vh と V $\lambda$  を繋ぐリンカーの作製では、Jh1、2、3、4 に対応する配列が 4 種類、V $\kappa$  に対応する配列が 6 種類、V $\lambda$  に対応する配列を 11 種類設計し、従って、5'側 3'側接着配列について 68 (4 x 17) 種類の異なる末端を有する Gly4Ser3 をコードするリンカーを用いて Vh 遺伝子断片と V $\lambda$  遺伝子

断片を連結し、一本鎖 Fv (scFv) 遺伝子断片を作製した。この scFv 断片を pCANRAB 5E (4.5 kb) の NotI と SfiI に組み込み 4 種類 (V $\gamma$ と V $\lambda$ 、V $\gamma$ と V $\kappa$ 、V $\mu$ と V $\gamma$ 、V $\mu$ と V $\kappa$ ) の抗体ライブラリーを作製した (6)。

### 3. パンニング

細胞表面パンニング法は D. L. Siegel らの方法に準じた (図 2、Ref: 8)。すなわち CCR5<sup>+</sup> 293 cells (1×10<sup>5</sup>) に 1mg/ml sulfo-NHS-LC-biotin/PBS を加え、細胞表面をビオチン化した。次に、アビジンと結合したマグネットビーズを反応させた。このラベル化された細胞に、あらかじめ反応させておいた (45 分間、4°C) CCR5<sup>-</sup> 293 cell (1×10<sup>8</sup> 個) と scFv ファージライブラリー (10<sup>12</sup> cfu/100  $\mu$ l) を加え、4°C で 60 分間反応させた。これらの混合液から Magnetically Activated Cell Sorting device (MACS: Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、CCR5 に特異的に結合しているファージを含む CCR5<sup>+</sup> 293 cell のみを回収した。結合したファージを pH 2.7 の 0.1M Glycine-HCl で溶出し、中和後大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。

プラスチックプレート法は既に報告している方法に準じた (1、9)。すなわち、ビオチン化 CCR5-L2 ペプチドと scFv ファージライブラリーを反応させ、CCR5-L2 に結合しているファージクローンをアビジンをコートしたプラスチックプレートに結合させ回収しクローン化した。

### 4. フローサイトメトリー

細胞とファージクローンを反応させ、洗浄後、ビオチン化抗 M13 抗体 (1:3000) を 30 分 4 度 C にて反応させ、Ultravidin-FITC (1:1000) を結合させ EPICS XL にて解析した。

#### 5. ELISA

96 穴イムノプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) にファージクローンを固定化し、ビオチン化 CCR5-L2 ペプチドを反応させストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼを反応させて ELISA を行った (1, 9)。

#### 6. 倫理面への配慮:

本論文では倫理面の問題は無い。

#### C. 研究結果

##### 1) CCR5<sup>+</sup>293 細胞を用いた細胞パンニング:

マグネットビーズを反応させた CCR5<sup>+</sup> 293 cells を MACS を用いて回収し、この操作を 2 度繰り返した。それぞれのサイクルの細胞から結合しているファージを増幅回収した。初回サイクルのファージと 2 回目サイクルのファージについてフローサイトメトリー解析を行った (図 3)。その結果、選別したポリクロナールファージ (50 $\mu$ l of 10<sup>12</sup> cfu/ml) は CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合活性を示したが、CCR5<sup>-</sup>293 細胞には結合しないことが明らかとなった。

##### 2) CCR5 合成ペプチド CCR5-L2 を用いたプラスチックパンニング:

エントリーインヒビター活性を有する抗 CCR5 抗体 2D7 のエピトープとして E171-K172 が示唆されている。我々の 2D7/m6

モチーフの解析からも S180-Q186 の配列とのホモロジーが明らかになっており (3)、さらにバクテリオロドプシンの解析から C178 がこの周辺の立体構造の安定化に関与している可能性が示唆されることより、図 4 に示した CCR5-L2 peptide を合成し、これに特異的結合活性を有するファージクローンの単離を試みた。プレリミナルな ELISA で 13 クローン中 4 クローンに強い反応が認められた。

#### D. 考察

ヒト一本鎖抗体 (scFv) 提示ファージライブラリー技術の革新的な意義として、ヒトの免疫系を試験管に入れて所有していることと同義であり、1) 特定のタンパク質に結合する抗体は、結合性を有するファージクローンを一匹釣り上げるだけで、特異抗体を作製できること、また、2) 単離された抗体は完全なヒト抗体であること、3) ファージライブラリーの免疫系は、免疫動物内で行われる自己と非自己の選別過程を経ることがないため、通常は作製することが困難な自己分子に対する抗体ファージが単離できることである。

私どもの作製したライブラリーの一つの特長として、20 名の健常人の末梢血リンパ球について、それぞれ独立して、IgM および IgG cDNA V gene の遺伝子増幅を行いライブラリーを作製し、それをプールした大規模なライブラリーであり、国際的にも優れた non-immune library であることが強調される。

Primer の設計は、基本的には、Marks, JD ら

(7) に従っているが、 $V_{\gamma}$ と $V_{\lambda}$ 、 $V_{\gamma}$ と $V_{\kappa}$ 、 $V_{\mu}$ と $V_{\gamma}$ 、 $V_{\mu}$ と $V_{\kappa}$ の4種の組み合わせのライブラリーを作製しており、*in vivo* selectionによる affinity maturation のプロセスを経していない、germline-type に近い V gene とその usage を反映させることができる。V 遺伝子ファミリーに特異的な primer を用いてライブラリークローンの V gene usage を個別に検討した結果、ライブラリーの V gene usage は健康人の末梢血リンパ球の V gene usage とほぼ同じであることが明らかとなっている (図5、6)。

私どものこれまでの検討で、ヒト MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$ R, IL-5R $\alpha$ , Fc $\epsilon$ RI にたいするヒト scFv の単離に成功しており、この scFv ライブラリーを用いることにより、きわめて高い確率でヒト分子に対するヒト抗体を得ることができることが明らかになっている (Ref. 10-18、日本免疫学会、2001)。

今後は Cell-surface panning 法、及び合成ペプチドによる panning により回収されてきたファージ集団から、CCR5 特異的クローンの単離を試みる。

#### F. 参考文献

1. T. Fukumoto, N. Torigoe, S. Kawabata, M. Murakami, T. Uede, T. Nishi, Y. Ito, K. Sugimura, Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T-cell proliferation, *Nature biotech.*, 16,

267-270, 1998

2. T. Fukumoto, N. Torigoe, Y. Ito, Y. Kajiwara, K. Sugimura, T cell proliferation augmenting activities of the gene 3 protein derived from a phage library clone with CD80-binding activity, *J. Immunol.* 161, 6622-6628, 1998

3. A. Meta, N. Torigoe, Y. Ito, R. Arakaki, H. Nakashima, and K. Sugimura. Inhibition of M-tropic HIV-1 infection by the fd phage-gene 3 protein with MIP-1 $\alpha$ -binding activity, *Mol. Immunol.* 36, 1249-1254, 1999

4. 杉村 和久、伊東 祐二、橋口 周平、中島 秀喜、中島 敏博、ケモカインレセプターを介した HIV 感染予防に関する研究、厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業：HIV 感染予防に関する研究、平成12年度総括・分担研究報告書、p47-59、2001

5. H. Kontos, T. Mirzabekov, J. Sodroski, W. Masasco, Identification of high affinity scFv antibodies against CCR5, from a novel non-immune phage display library using paramagnetic proteoliposomes, in posters of Phage display Technologies: Directed protein evolution by Cambridge Healthtech Institute, April 9-10, 2001 @ Cambridge, MA.

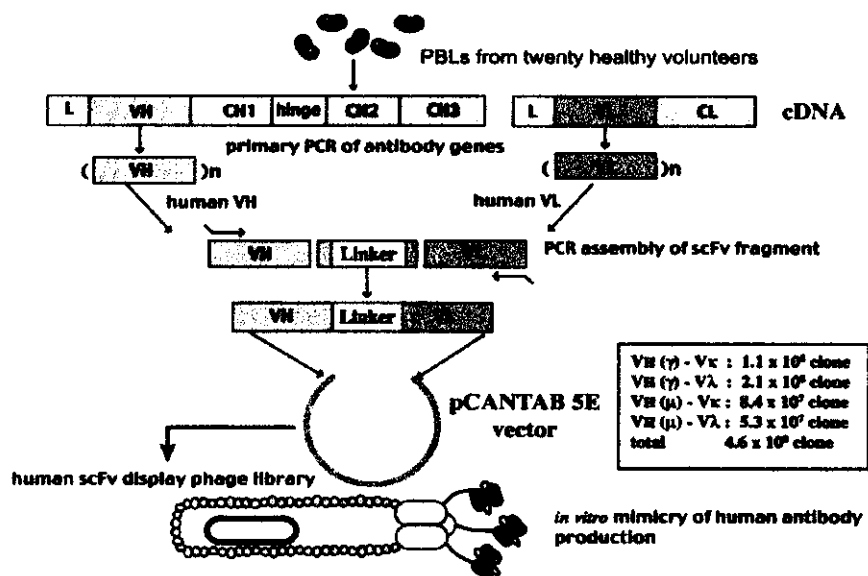
6. S. Hashiguchi, A. Nitani, T. Nakashima, Y. Ito, K. Sugimura, Human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -specific human single chain Fv (scFv) antibody with an antagonistic activity

- to the IgE/ FcεRIα-binding, S. Hashiguchi et al., in preparation
7. J.D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991
  8. D.L. Siegel, Cell-surface selection and analysis of monoclonal antibodies from phage libraries, *Phage Display: A laboratory manual* Ed. by C.F. Barbas III, D.R. Burton, J.K. Scott, G.J. Silverman, p23.1-23.5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
  9. M. Kaji, M. Ikari, S. Hashiguchi, Y. Ito, R. Matsumoto, T. Yoshimura, J. Kuratsu and K. Sugimura, Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity, *J. Biochem.* 129: 577-583, 2001
  10. 山本真紀、橋口周平、中島敏博、柿田実里、伊東祐二、高津聖志、富永明、杉村和久、IL-5レセプターに特異的に結合するヒトscFv抗体ファージクローンの単離、アレルギー 50: No.9-10, p979, 2001
  11. 源島龍、田中孝一、橋口周平、伊東祐二、奥畑聡子、吉崎和幸、杉村和久、ペプチドあるいはヒト一本鎖抗体ファージライブラリーを用いた IL-6 シグナリング阻害分子の検索 第31回日本免疫学会総会・学術集会記録 31: p62, 2001
  12. 橋口周平、吉永圭介、吉原智樹、中島敏博、伊東祐二、杉村和久、可溶性FcεRIα鎖に結合するヒト一本鎖抗体の単離とその評価、アレルギー、50: p979, 2001
  13. Hashiguchi S, Nitani A, Nakashima T, Ito Y, Sugimura K, Human FcεRI-specific human single chain Fv (scFv) antibody *Scand. J. Immunol.*, 54(Thu) p103, 2001
  14. K. Sugimura, R. Gejima, T. Nakashima, S. Hashiguchi, Y. Ito, S. Okuhata, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, Anti-IL-6 antibody-binding motif peptides inhibiting the signaling of human IL-6 to human IL-6 receptor but not murine IL-6 receptor *Scand. J. Immunol.*, 54(Wed) p105 2001
  15. 吉永圭介、橋口周平、吉原智樹、伊東祐二、杉村和久、可溶性FcεRIα鎖に結合するヒト一本鎖抗体の単離とそのシグナル阻害活性、*Proc.Jap.Soc.Immunol.* 31: p38, 2001
  16. 木村葵、伊東祐二、末次加奈、山下早希子、橋口周平、杉村和久、補助刺激分子CD86、CD28に特異的に結合するヒト一本鎖抗体ファージクローンの単離、*Proc.Jap.Soc.Immunol.* 31: p298, 2001
  17. 奥菌剛、宇都倫史、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、TNF シグナリングを阻害する TNFR1 特異的ヒト一本鎖抗体の単離 *Proc.Jap.Soc.Immunol.* 31: p61, 2001
  18. 新村靖彦、崔学柱、橋口周平、伊東祐二、杉村和久、cell-panningを用いたCCR5に結合するヒトscFv抗体ファージクローンの探索、*Proc.Jap.Soc.Immunol.* 31: p24, 2001



☒ 1

## Construction of human scFv display phage library



☒ 2

### Strategy for cell-surface panning of phage-display libraries

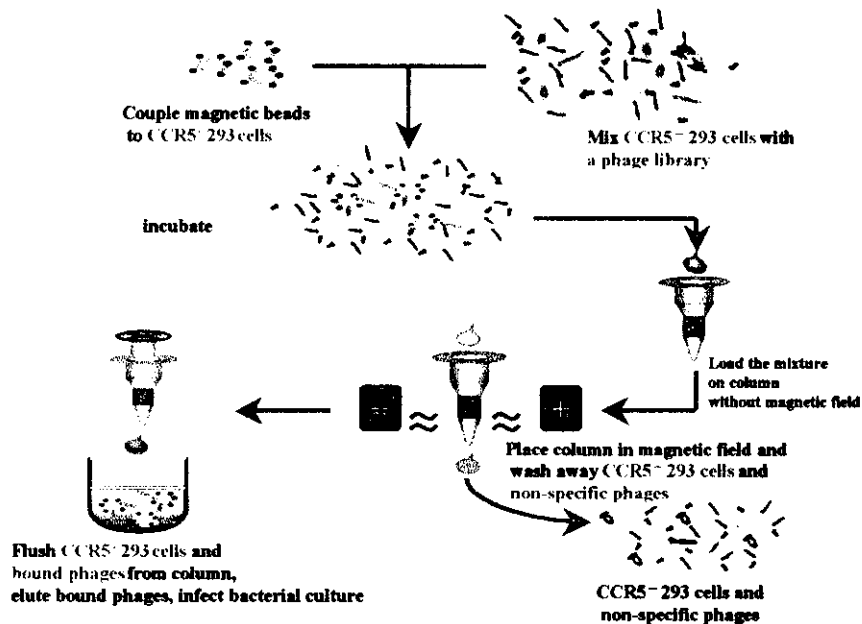


図 3

*Binding of polyclonal phage to CCR5 expressing cell*

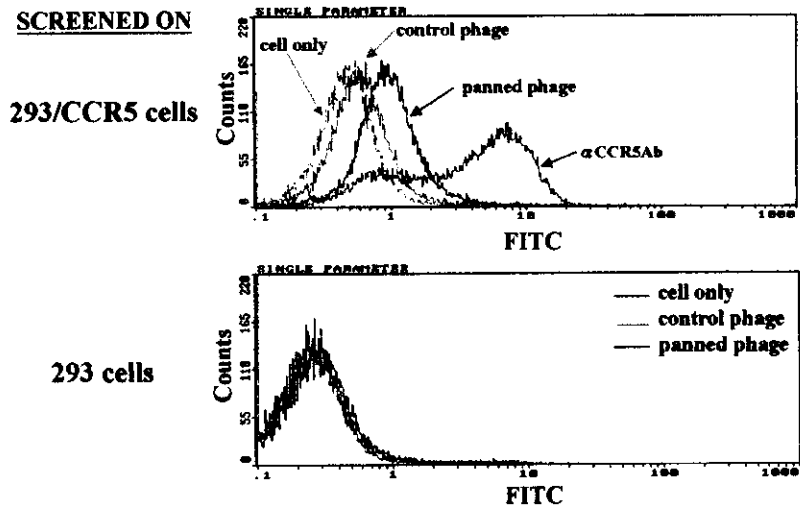


図 4

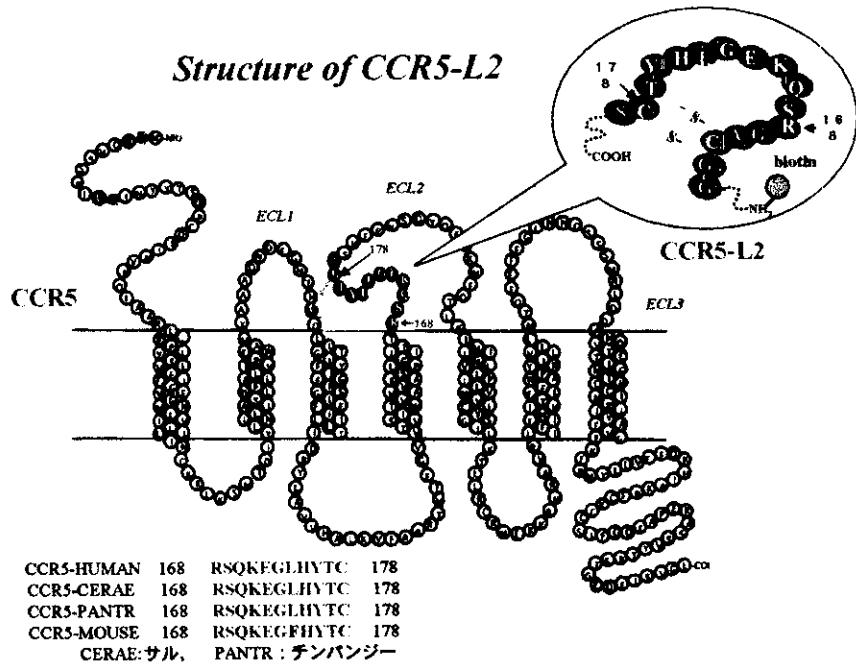


図 5

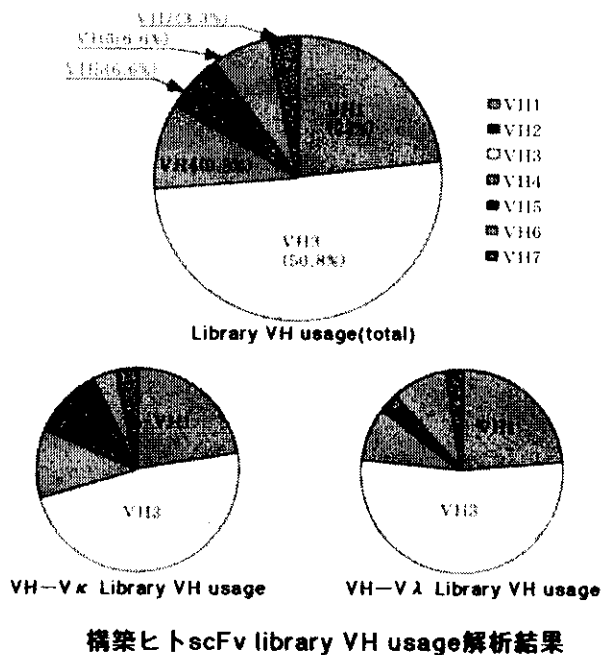
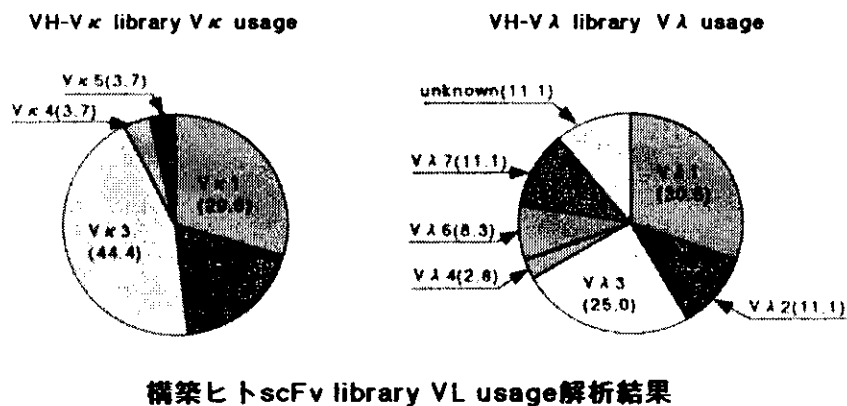


図 6



### 細胞性免疫誘導型エイズワクチンに関する研究

分担研究者 水落 次男（東海大学工学部 教授）  
共同研究者 小島 直也（東海大学工学部 助教授）  
共同研究者 中田 宗宏（東海大学工学部 助教授）

**研究要旨：**封入抗原に特異的な DTH や CTL を誘導でき、人に対して使用可能な人工糖脂質 (M5-DPPE) をアジュバントとするエイズワクチンの開発のためには、M5-DPPE 被覆リポソームの品質管理法と長期保存法の確立が急がれている。そこで本年度は M5-DPPE 被覆リポソームの品質管理に用いる M5-DPPE 被覆リポソーム構成脂質成分の簡便で迅速な定量法の開発を試みるとともに、水溶液中に懸濁したリポソームを凍結乾燥後再水和して得られる再水和リポソームが凍結乾燥状態で長期間保存可能であることに着目し、再水和法を応用した人工糖脂質被覆リポソームを作製することを試みた。

まず、紫外吸収による検出が困難な脂質成分の検出に効果的なエバポレイティブ光散乱ディテクター (ELSD) とトリメチル基結合シリカカラム (TMS カラム) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を構築し、M5-DPPE で被覆したリポソームの構成成分を迅速に同時定量できる手法を確立した。この定量法の確立により、M5-DPPE 被覆リポソームを用いたエイズワクチンの品質管理が可能になった。次に、簡便な抗原封入人工糖脂質被覆リポソームの作製法を再水和法を応用して確立した。すなわち、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とコレステロールおよび M5-DPPE を用いて作製した脂質フィルムに蒸留水を加えボルテックスミキサーを用いて作製したマルチラメラリポソームを凍結乾燥し、リポソームの凍結乾燥粉末に BSA を含む PBS を加え軽く振盪することで抗原封入人工糖脂質被覆リポソームを作製することが可能であった。人工糖脂質被覆再水和法リポソームのタンパク質封入率は、従来法で作製したものとほぼ同じであった。さらに、再水和法リポソームもマンノースを認識するレクチンであるコンカナバリン A による凝集がみられたことから、リポソーム表面にマンノペンタオースが露出していることが判明した。次いで、人工糖脂質被覆再水和法リポソームの DTH 誘導能を検討したところ、抗原を封入した人工糖脂質被覆再水和法リポソームは従来法で作製した抗原封入人工糖脂質被覆リポソームと同様に、封入抗原 (BSA) に特異的な強い DTH 誘導能を示した。これらの結果は、再水和法による人工糖脂質被覆リポソームが、細胞性免疫を誘導し安全かつ長期保存可能なアジュバントとして大変有望であることを示しており、実用的なワクチンとしても利用可能であること意味しているといえる。

#### A. 研究目的

最近、エイズウイルス (HIV) の感染防御や HIV 感染者の病態制御において細胞性免疫を誘導するようなワクチンの開発の重要性が指摘されている。

また、HIV のタンパク質あるいはその部分ペプチドはアジュバントとともに投与しないと細胞性免疫を誘導できないことも知られている。しかし、効果的な細胞性免疫誘導能をもち、ヒトに対して