

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書

第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬の
開発に関する研究

HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究

所属 日水製薬株式会社イノベーション

リサーチセンター

研究者 梅田 衛

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 向井鎌三郎 室長
- (2) 熊本大学薬学部 庄司省三 教授
- (3) 熊本大学薬学部 三隅将吾 助手
- (4) 熊本大学薬学部 高宗暢暁 助手

要旨

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の Undecapeptidyl Arch 構造 (UPA) をミミクした環状 peptide 抗原に対する特異抗体は濃度依存的に HIV-1 の X4 (LAV-1), R5 (JRFL), R5/X4 (89.6) のウイルスの感染を防止した。これら抗原は HIV-1 ディフェンスワクチンとして期待できる。

1. 研究の目的

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の第2細胞外ループ (ECL-2) の N-末端から 11 アミノ酸残基をへだてた undecapeptidyl ドメインは特異的立体構造 (Undecapeptidyl Arch, UPA: CXCR4, N₁₇₆VSEADDRYIC; CCR5, R₁₆₉SQKEGLHYTC) を形成し、HIV-1 の吸着・侵入に critical であると考えられている。CXCR4・CCR5 の各々の UPA および両 UPA の各々 5 アミノ酸残基 (CXCR4:EADDR; CCR5:SQKEG) に基づく環状 dodecapeptide (cDDX4, cDDR5, cCD) を multiantigen peptide (MAP) に結合させ、免疫抗原 (cDDX4-MAP to CXCR4, cDDR5-MAP to CCR5, cCD-MAP to chimeric UPA) として用い、HIV-1 感染防止ワクチンとしての基礎研究を行う。

2. 研究方法

(1) ワクチンとしての HIV-1 coreceptor 由来の特殊立体構造ペプチドの構築

1) CXCR4, CCR5 の構造

CXCR4・CCR5 の全立体構造を計算化学的にコンピューターを用いて求めることは、現時点において極めて困難であるので、まず始めに、UPA の構造について予測を行う。

○UPA構造 (CXCR4,CCR5) の立体構造予測

CXCR4 CCR5のUPAのポリペプチド鎖 (N₁₇₆VSEA₁₈₀DDRYI₁₈₆・R₁₆₈SQ₁₇₀KEGLHYT₁₇₇)にスパーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入し環状構造化して、計算化学的およびspace-filling modelを構築して検討する。さらに、主エピトープと考えられるそれぞれ5アミノ酸残基(CXCR4:EADDR;CCR5:SQKEG)スパーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入したCXCR4-CCR5キメラUPA構造を構築し、同様に検討する。

○これらペプチドの構造の解析

これらのペプチドを実際に化学合成し、その質量数をMALDI-TOF-MSを用いて調べる。

○免疫抗原・screening抗原の調製

これらのペプチドはmulti antigen peptideおよびマルチピンに結合させ、前者を免疫抗原、後者をscreening抗原として用い、ELISA法により抗体価を求める。

(2) これら環状ペプチド抗原から産生された単クローン抗体の作出および生物活性

1).抗体の免疫化学的性質

作出された単クローン抗体の免疫化学的性質のうち、抗体の抗原特異性については、それぞれの抗原の直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを用いて、競合実験を行い測定はELISA法による。

2)作出された単クローン抗体のreceptor特異性の測定

CXCR4, CCR5を発現している細胞(NP2/CD4/CXCR4, NP2/CD4/CCR5、NP2/CD4)を用いてFlow cytometryによる。

(3) 抗体の生物活性

1)抗HIV活性

MAGIC-5, MAGI-CCR5 cellを用い、HIV-1感染によって生じるブルーセルを顕微鏡下計測して抗HIV活性を求める。

2)ケモタキシス活性の測定

トランスウエルを用い、上層wellにエフェクターセル(Molt4#8, THP-1)を入れ、ケモカインにより誘導される化学走性に対する本抗体の効果について調べる。

3)Ca²⁺流入活性の測定

ケモカインによって誘導される細胞内Ca²⁺流入に対する本抗体の効果を、蛍光Ca試薬Fluo3AMおよびFlow cytometryを用いて調べる。

(4)アジュバンドの検討

従来のアジュバンドに加え、アラムアジュバンドの本抗原ペプチド-MAP に対する適用性を調べる。

3. 研究成果

(1). CXCR4, CCR5 の UPA 由来の環状 peptide の質量分析

CXCR4, CCR5 の UPA 由来の環状 peptide のうち、cCDpeptide の MALDI- TOF -MS の結果、直鎖状 DSKQKEGEADDRG peptide のアミノ末端およびカルボキシル末端が酸アミド結合を介して環状化していることを確認した。

(2). 3 種の環状 peptide のうち、cDDR5 の立体構造の予測の結果、cDDR5 の官能基が 120 度開いた構造をとり、立体的に特異的であることが認められた。

(3). 抗体の免疫化学的性質

作出された単クローン抗体の免疫化学的性質のうち、抗体の抗原特異性については、それぞれの抗原の直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを用いて、競合実験を行い、本抗体は環状ペプチドと反応し、直鎖状ペプチドとは反応しなかった。また、本抗体は CXCR4 および CCR5 を発現している細胞 (NP2/CD4/CXCR4, NP2/CD4/CCR5, NP2/CD4) に反応することが Flow cytometry 分析によって確認された。

(4). 抗体の抗 HIV 活性

抗 HIV 活性を MAGIC-5 および MAGI-CCR5 cell を用い、HIV-1 感染によって生じるブルーセルを顕微鏡下計測して抗 HIV 活性を求めた結果、本抗体は種々 (X4, R5, R5/X4 virus) HIV-1 株に有効で、濃度依存的にこれら HIV-1 の感染を防止した。

(5) 本抗体の HIV-1 の組み込みおよびケモタキシス活性並びに Ca^{2+} 流入に対する効果。

本抗体が HIV-1 の感染を防止する濃度で HIV-1 の宿主遺伝子への組み込みを PCR 法で調べた結果、本抗体は感染を防止濃度で HIV-1 の宿主遺伝子への組み込みをほぼ完全に阻止し、また、ケモカインにより誘導される化学走性および細胞内 Ca^{2+} 流入を阻害しなかった。

(6) ワクチンとしての基礎研究

1). 小動物に対する安全性試験

抗原ペプチドの安全性を小動物 (マウス、10匹) を用いて、抗体調製と同時に 0.3mg/匹を腹腔・皮下注射して調べた結果、マウスは正常に生育した。

2). ワクチンとしても用いる場合のアジュバンドの検討

毒性の少ないアラムアジュバンドを常法に従い水酸化アルミニウムから調製して、マウスに免疫した結果、抗体の産生はみられたが抗体価がフロインドの完全アジュバンドに比較して低いことがわかったので、ヒトに対する免疫においてはさらに検討する必要がある。

4. 考察

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の第 2 細胞外ループ (ECL-2) の特異的立体構造ドメイン

(Undecapeptidyl Arch, UPA : CXCR4, N₁₇₆VSEADDRYIC ; CCR5, R₁₆₉SQKEGLHYTC) の立体化学的基礎に立脚して、酸アミド結合を介して環状 dodecapeptide cDDX4 および cDDR5 を、また、両 UPA の各々 5 アミノ酸残基 (CXCR4:EADDR; CCR5:SQKEG) およびスパーサーアームジペプチドからなる特異的立体超構造を有するキメラ環状 dodecapeptide、cCD を得た。これら環状化 peptides (cDDX4、cDDR5、cCD) およびこれらペプチドを multiantigen peptide (MAP) に結合させた免疫抗原 (cDDX4-MAP, cDDR5-MAP, cCD-MAP) の質量数をレーザー質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いて、解析し、本精製抗原の化学的根拠を明確にした。

HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA および UPA をミミクした免疫抗原の立体構造を構造モデル法あるいは化学計算法により求めた結果、UPA と UPA をミミクした環状 peptides 構造のグルタミン酸残基の γ -カルボキシル基、アスパラギン酸残基の β -カルボキシル基、あるいはリジン残基の ϵ -アミノ基の立体的配位は非常によく一致した。このことは環状 peptide-MAP は HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA の立体構造を反映していると考えられる。

3 種の免疫抗原のうち、まずはじめに、cCD-MAP に対する単クローン抗体を作出した。cCD-MAP に対する単クローン抗体 (CPMab-I, IgM κ) は環状キメラ UPA と反応し、直鎖状のキメラ UPA とは反応しなかった。Flow cytometry 分析の結果、CPMab-I は CXCR4 および CCR5 を別々に発現した CD4+NP-2 細胞と反応することが確認され、CPMab-I は立体構造を認識する抗体であると考えられる。

MAGIC-5 assay 法により、CPMab-I の HIV-1 (X4, R5, R5/X4 virus) の感染防止作用を調べた結果、本抗体は濃度依存的に HIV-1 の X4 (LAV-1), R5 (JRFL), R5/X4 (89.6) のウイルスの感染を防止し、HIV-1 proviral DNA の宿主への組み込みを阻害した。これは本抗体が HIV-1 の coreceptors (CXCR4, CCR5) と反応し、HIV の吸着・進入を阻止すると考えられる。また、本抗体はケモカイン (SDF-1 α) が誘導する chemotaxis および Ca²⁺ イオンの細胞内流入を HIV-1 の感染を防止する濃度で影響を与えなかった。なお、cDDX4-MAP・cDDR5-MAP に関する免疫化学的基礎研究は現在進行中である。

5. まとめ

HIV-1 の吸着・侵入に critical であると考えられている HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の特異的立体構造ドメイン (Undecapeptidyl Arch, UPA : CXCR4, N₁₇₆VSEADDRYIC ; CCR5, R₁₆₉SQKEGLHYTC) に基づく環状 peptides (cDDX4, cDDR5) およびそのキメラ環状 dodecapeptide (cCD) を合成し、multiantigen peptide (MAP) に結合させた免疫抗原 (cDDX4-MAP, cDDR5-MAP, cCD-MAP) を調製した。これら環状免疫抗原 peptides は intact の UPA の構造を反映していることを明らかにした。最初に作出した cCD-MAP に対する単クローン抗体 (CPMab-I, IgM κ) は立体構造を認識する抗体で、濃度依存的に HIV-1 の X4 (LAV-1), R5 (JRFL), R5/X4 (89.6) のウイル

スの感染を防止し、ケモカイン (SDF.1 α) が誘導する chemotaxis および Ca イオンの細胞内流入に HIV-1 の感染を防止する濃度で影響を与えなかった。

6. 研究発表

1) Misumi, S., R. Nakajima, N. Takamune, and S. Shoji. (2001) A cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate from undecapeptidyl arch (from Arg168 to Cys178) of extracellular loop 2 in CCR5 as a novel HIV-1 vaccine. *J. Virol.*, 75, 11614-11620.

2) Misumi, S., N. Takamune, Y. Ido, S. Hayashi, M. Endo, R. Mukai, K. Tachibana, M. Umeda, and S. Shoji. (2001) Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide warped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285:1309-1316.

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社