

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
- (2) 熊本大学薬学部 庄司省三
- (3) 熊本大学薬学部 三隅将吾
- (4) 熊本大学薬学部 高宗暢暁

要旨

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) に注目し、これらのペプチドから Cys 残基を除き、また、両 UPA のエピトープ (各々の5アミノ酸残基) から構成されるキメラデカペプチド (SQKEGEADDR) を考案した。これらデカペプチドにスパーサーアームドジペプチド (Gly-Asp) 挿入して、酸アミド結合を介して環状化後、multiantigen peptide (MAP) を導入した。これら3種の安定な環状ペプチド-MAP 抗原 (cDDX4-MAP to CXCR4, cDDR5-MAP to CCR5, cCD-MAP to chimeric UPA) の計算化学で求めた立体構造は、UPA の特異的立体構造とよく適合した。cCD-MAP 抗原に対して数種の単クローン抗体が得られ、これら抗体は HIV-1 X4, R5, X4/R5 ウイルスの感染をほぼ完全に阻止した。3種の抗原を用いる「HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究」が継続中であるので、現在進行中の結果について要約する。

- (1)。3種の免疫抗原、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。
- (2)。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。
- (3)。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。
- (4)。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た。

(5)。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)のすべてのウイルスの感染を防止した。

(6)。HIV-1 の感染を防止する本抗体の濃度で Molt-4#4 への HIV-1 proviral DNA の組み込みは認められなかった。

(7)。HIV-1 の感染を防止する本抗体の濃度で、ケモカインで誘導される Molt-4#4 の chemotaxis および Ca イオンの細胞内流入の阻止は認められなかった。

(8)。cCD-MAP をカニクイサルに免疫した結果、3 匹のうち、1 匹には高い抗体価、他の 1 匹には低い抗体価が認められ、残りの 1 匹には有意の抗体の誘導は認められなかった。基礎免疫から、6・8 週目の抗体誘導の認められたサル血清は *in vitro* で HIV-1 の感染を強力に阻害した。なお、MAP のみを用いたコントロール実験において、3 匹のサルには本抗体の誘導は認められず、またコントロール血清は *in vitro* で HIV-1 の感染を阻害しなかった。

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 undcapeptidyl ドメインは特異的立体構造 (Undcapeptidyl Arch, UPA : CXCR4、N₁₇₆VSEADRYIC ; 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) に基づく環状ポリペプチド(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の立体構造

○UPA構造 (CXCR4,CCR5) の立体構造予測

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。CXCR4 CCR5のUPAのポリペプチド鎖 (N₁₇₆V SEA₁₈₀DDRYI₁₈₆・R₁₆₉SQ₁₇₀KEGLHYT₁₇₇)にスペ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 fit 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)スペーサーアームペプチド(Gly-Asp)を挿入したCXCR4-CCR5キメラUPA構造の構築し、同様に検討する。

○これらペプチドの立体構造の解析

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およびこれら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法およびBIACORE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によった。

(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 由来の環状ペプチドの質量分析

CXCR4,CCR5 の UPA 由来の環状 peptide のうち、cCD ペプチドの MALDI- TOF -MS の結果、直鎖状 DSKQKEGEADDRG 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が明確になった。

(2).3 種の環状ペプチドのうち、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、本単クローン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).抗体の生物活性

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Ca²⁺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た。また、本抗体はケモカインにより誘導される化学走性および細胞内Ca²⁺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、用い、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、極め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ポリペプチド、cCD を得た。これら環状化ペプチド (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 Ca 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 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 (Undeca-peptidyl Arch, UPA : CXCR4, N₁₇₆VSEADDRYIC ; CCR5, R₁₆₉SQKEGLHYTC) をミミクスパーサーアームジペプチドを含む環状ポリペプチド (cDDX4, cDDR5) および両UPAの各々5アミノ酸残基 (CXCR4:EADDR;CCR5:SQKEG) および同様にパーサーアームジペプチドを含むキメラ環状ポリペプチド (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 peptides 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 をミミクス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 をミミクスした環状 peptides 構造はほぼ一致することがわかった。

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)のすべて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を HIV-1 の感染を防止する濃度で阻止しなかった。

6. 研究発表

- (1) Shogo Misumi, Masafumi Endo, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, Tetsuro Honda, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji, A novel cyclic peptide vaccine for defense against HIV/AIDS progression. J. Biol. Chem. Submission.
- (2) Shogo Misumi, Yukimi Morikawa, Mitsunori Tomonaga, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji. Autonomic Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Protease by the Autologous p2_{gag}Peptide. J. Virol. Submission.
- (3) Shogo Misumi, Takashi Fuchigami, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji. Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics using two-dimensional gelelectrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. J. Virol. 76, 10000-10008. (2002)
- (4) Nobutoki Takamune, Hirotoshi Hamada, Hideki Sugawara, Shogo Misumi, and Shozo Shoji. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of activity of myristoyl Coenzyme A: protein N-myristoyltransferase. Anal. Biochem. 309, 137-142 (2002)
- (5) Nobutoki Takamune, Hirotoshi Hamada, Shogo Misumi, and Shozo Shoji. Novel strategy for anti-HIV-1 action: selective cytotoxic effect of N-myristoyltransferase inhibitor on HIV-1-infected cells. FEBS Lett. 527, 138-142(2002)

- (6) Takashi Fuchigami, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji. Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1107-1113 (2002)
- (7) 庄司省三、三隅将吾. HIV-1 粒子のプロテオーム解析. *日本臨床* 60 卷 4 号、636-640 (2002)
- (8) Shogo Misumi, Nobuoki Takamune, Yasuhide Ido, Shinichiro Hayashi, Masafumi Endo, Ryouzaburou Mukai, Kuniomi Tachibana, Mamoru Umeda, and Shozo Shoji, 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(5), 1309-1316 (2001)
- (9) Shogo Misumi, Reina Nakajima, Nobuoki Takamune, and Shozo Shoji, A cyclic dodecapeptide-multiple-antigen-peptide-conjugate from undecapeptidyl arch (from Arg168 to Cys178) of extracellular loop2 in CCR5 as a novel HIV-1 vaccine. *J. Virol.* 75, 11614-11620 (2001)
- (10) Nobutoki Takamune, Tadahiro Tanaka, Hiroki Takeuchi, Shogo Misumi, and Shozo Shoji, Down-regulation of N-myristoyl transferase expression in human T-cell line CEM by human immunodeficiency virus type-1 infection. *FEBS Lett.* 506, 81-84 (2001).
- (11) Shiraishi T, Misumi S, Takama M, Takahashi I, and Shoji S. Myristoylation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Protein Is Required for Efficient env Protein Transportation to the Surface of Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1201-1205 (2001)
- (12) Shoji Shozo, Misumi Shogo, Nobutoki Takamune. 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. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, August 24th-27th, 2002. 10.1, P-124

7. 知的所有権の取得状況

(1). 特許出願中

出願番号：wo00/47609, 出願日：1999年2月10日

Title: Cyclic peptides and AIDS vaccines

発明者：庄司省三

出願人：日水製薬株式会社