

HIV-1 ディフェンスワクチンの創製・開発研究

所属 日水製薬株式会社診断薬研究部

イノベーションリサーチグループ

研究者 梅田 衛

研究要旨 HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) のウイルスの吸着・侵入に必須なドメイン (Undcapeptidyl Arch、UPA : CXCR4、N₁₇₆VSEADDRYIC ; CCR5、R₁₆₉SQKEGLHYTC) に基づく環状 dodecapeptide (cDDR5) 抗原をカニクイサルに免疫し、SHIVsf162P3K 株をに静注して challenge した。その結果、3 頭とも、control に較べて、血中の Viral loads が 2log-3log 低下する感染防御効果が認められた。さらに、より完全に HIV-1 の感染防御のために自己抗原、液性・細胞性免疫抗原、M細胞標的抗原・B-1 細胞活性化抗原の三位一体抗原の創製・開発のための基礎研究を行っている。

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 三隅将吾助教授
- (4) 熊本大学薬学部 高宗暢暁助手

A. 研究の目的

2001年2月にヒトのゲノム分析が終了し、解読、解析が始まり、生命情報(バイオインフォマテクス)が刻々と蓄積してヒト生命現象が克明に解き明かされ始めている、にもかかわらず、エイズワクチンの開発の困難さが改めて再認識されている。そこで主任研究者らは、ワクチンの基本的な理論を逸脱し、生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を自己抗体に求めた。研究代表者等の究極の目標は HIV-1 の侵入に備え、適応免疫が発動するまでの Death time(6~12 時間)、この無防備の時間を CCR5 の UPA に対する自己抗体で守り、自己抗体常時誘導抗原、液性・細胞性免疫抗原、M細胞標的抗原・B-1 細胞活性化抗原を同一分子内にもつ、三位一体抗原を作出し、かつ、経口粘膜免疫法すなわち、「飲むエイズワクチンをつくる。」ための基礎研究である。そのために、HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) を基礎に、HIV-1 感染防止に有効な HIV-1 ディフェンス

ワクチンを考案・提案し、HIV-1 の感染防止を目的とする。

B. 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の構築・解析

ペプチドは Fmoc Chemistry によって、化学的に合成し、得られたペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端を酸アミド結合を介して環状化し、特殊立体構造を構築する。これらペプチドを質量化学・計算化学的に特殊立体構造を解析する。

1) CXCR4 UPA のポリペプチド鎖 (N₁₇₆VSEA₁₈₀DDRYI₁₈₆) にスパーサーアームペプチド (Gly-Asp) を挿入して環状構造化

2) CCR5 UPA のポリペプチド鎖 (R₁₆₉SQ₁₇₀KEGLHYT₁₇₇) にスパーサーアームペプチド (Gly-Asp) を挿入し環状構造化

3) CXCR4-UPA および CCR5-UPA の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 構造の構築

4) 免疫抗原 これらのペプチドはポリリジン (MAP: multi antigen peptide) を carrier とし、MAP-

樹脂を用いて結合させ、脱保護、脱樹脂を行い、環状ペプチドMAPとして免疫抗原として調製する。また、環状ペプチドをマルチピンに結合させ、assay抗原としてELISA法によって抗体価を求め。

(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

抗体の免疫化学的性質

- 1) 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特異性の測定は、CXCR4, CCR5を発現している細胞(NP2/CD4/CXCR4, NP2/CD4/CCR5, NP2/CD4)を用いてフローサイトメータによる。

(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。
- 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、蛍光Ca試薬Fluo3AMおよびフローサイトメータを用いて検出する。

(4) カニクイサルに対する免疫

B virus, SVV, SRV, STLV 抗体陰性カニクイサル(中国産) 4歳、オス、体重2.9~3.6 kg、9頭(予備実験としてcDDR5-MAP免疫サル3頭[No. 4, 5, and

6]、本実験として免疫サル3頭[No. 11, 13, and 16]コントロールとしてMAP-免疫サル3頭[No. 7, 8, and 9])を用いた。アジュバントは Freund complete adjuvant(FCA) または Freund incomplete adjuvant(FIA)を用いた。0 および 1 週後に 300 μg の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FCA を含むエマルジョンを腹腔に注射し、6 週後に 300μg の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FIA を含むエマルジョンを皮下に注射した。

初回免疫前(pre)、初回免疫 0、2、4、6、8、及び 10 週後に採血を行い血清を分離し、抗血清として用いた。2 回目免疫から 5 週目に追加免疫をし、予備実験で得られて結果に基づき、さらに 5 週目に SHIVsf162P3 株を 10TCID50, 静注に challenge した。Challenge 後、1 週、3 週、4 週目に採血し、viral load, CD4 (+), CD8 (+) 細胞数を測定した。なお、SHIVsf162P3 株は予め、カニクイサル PBMC に感染させ、適合させて用いた。

(5) 抗体及び抗血清の諸性質の検討

1) 免疫サル血清の CCR5 に対する反応性

まず、始めに予備実験としてサル No. 4, 5, 及び 6 を用い、cDDR5-MAP 抗原を免疫し、抗体の産生をしらべた。No. 4, 5, 及び 6 サル抗血清(pre and 8 weeks) および MAP 抗原を免疫したコントロール No. 7, 8, 及び 9 サル抗血清(pre and 8 weeks) 及び透析処理(Mw100,000 cut off) したものを、MAGIC-5 細胞に処理し、洗浄後 FITC-conjugated goat anti-monkey IgG を反応させフローサイトメータで分析した。また CCR5 に対する特異的なリガンドとして知られる MIP-1 beta (100 ng/ml) を competitor として用いた。

2) HIV-1 感染防止効果測定

ウイルスは clade B として HIV-1 JRFL 株 (R5 ウイルス) または HIV-1 LAV 株 (X4 ウイルス) を用い

た。また non-clade B HIV-1 として HIV-193RW004 (clade A), HIV-1MJ4 (clade C), および HIV-192TH009 (clade E) を NIH AIDS Research & Reference Reagent Program から入手し、ヒト PBMC に感染させ propagate したウイルスを用いた。MAGIC-5 cell に対し、抗血清存在下あるいは非存在下 HIV-1 (R5, X4 ウイルス) を感染させ、感染を示すブルー細胞数を顕微鏡下計測した (MAGIC-5 assay)。

(倫理面への配慮)

- (1) 日水製薬において実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (2) 熊本大学において熊本大学実験動物倫理会の規則に従い、動物愛護上の諸問題に配慮して行う。
- (3) ハムリー株式会社において、同社内に設置されてある実験動物倫理委員会の規則に従ってサルに対する実験を行う。

C. 研究成果

(1) HIV-1 coreceptor由来の特殊立体構造ペプチドの構造解析

- 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 MALDI-TOF MS の結果、直鎖状 peptide のアミ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が確認された。
- 2) 3種の環状 peptide の立体構造の予測の結果: 3種の環状 peptide の立体構造は intact な構造を取りうるということがわかった。
- (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、ELISA 法の結果、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) に反応することがフローサイトメータによって確認された。

- 2) 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。
- 3) 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た。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た結果、本抗体はケモカインにより誘導される化学走性を阻害しなかった。ケモカインによって誘導される細胞内 Ca^{2+} 流入に対する本抗体の効果を、蛍光 Ca 試薬 Fluo3AM およびフローサイトメーターを用いて調べた結果、本抗体はケモカインによって誘導される細胞内 Ca^{2+} 流入を阻害しなかった。

(4) カニクイサルに対する免疫

- 1) 抗血清の CCR5 への反応性に関する検討
cDDR5-MAP 抗原を免疫したサルに血清中に CCR5 に対する抗体が誘導されていることを調べるため、cDDR5-MAP 抗原免疫前 (pre) 後 (8 weeks) の血清および MAP 抗原免疫コントロールサル血清を透析処理後 CCR5 を高発現している CEM-CCR5 細胞に処理した。

さらに2次抗体として FITC-conjugated goat anti-monkey IgG を反応させフローサイトメータで分析した。その結果、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No. 11、13、および16 サル血清(8 weeks)を反応させた CEM-CCR5 細胞は明らかに蛍光強度が増大し、特に No. 16 サル血清においては400倍以上希釈しても、有意の反応が認められた。一方MAP 抗原を免疫した No. 7, 8, および9 サル血清においては免疫前後で血清の反応性に変化は認められなかった。

2) HIV-1 感染防止効果測定

cDDR5-MAP 抗原を免疫したサル血清(8 w, No. 11, 13, 16) およびMAP 抗原を免疫したコントロール血清(No. 7, 8, 9) または各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した後、clade B HIV-1 (JRFL, R5) 及び SHIVsf162P3 (R5) に対する感染防止効果をMAGIC-5 assay によって評価した。その結果、R5 virus である HIV-1 JRFL 株及び SHIVsf162P3 株に対していずれのサルの pre 血清では抗 HIV 効果が認められないのに対し、免疫後8 weeks の血清において著しい感染防止効果を示した。一方 X4 virus である LAV-1 株に対して、いずれのサル血清(pre, 8 w, 10 w) も感染防止効果を示さなかった。この効果は各血清を透析処理 (Mw100,000 cut off) した場合でも同様であった。またMAP 抗原免疫サルのいずれの血清も HIV-1 JRFL 株および HIV-1 LAV-1 株に対して感染防止効果を示さなかった。

D. 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 (Undcapeptidyl 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ポリペプチド 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。これら環状化ポリペプチド (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 抗原は HIV-1 の coreceptor (CXCR4, CCR5) の UPA に対する抗体調製に有効であると考えられる。

分担研究者らは、CCR5 の UPA の立体構造をミミクした抗原ペプチド cDDR5-MAP を調製し、さらにこれを免疫抗原としマウスを用いて作出した単クローン抗体が、細胞表面の native な human CCR5 に特異的に結合し、HIV-1 R5 ウイルスである JRFL 株の感染を阻害する活性を有することを明らかにした。この結果から、cDDR5-MAP が、CCR5 を認識し HIV-1 R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であることが明らかにした。

FCA および FIA をアジュバントとして cDDR5-MAP を免疫したカニクイサルの透析処理抗血清 (Mw100,000 cut off) は、BIAcore 分析の結果、cDDR5 センサーチップと特異的に結合したことから、抗血清中には cDDR5 に対する抗体の存在が示唆された (data not shown)。また、この血清中に含まれる抗体が CCR5 の native 構造を認識するかどうかを検討した結果、CEM-CCR5 細胞の CCR5 を認識する抗体を含むことが確認された。さらに、cDDR5-MAP 免疫で

誘導された血清中の抗 CCR5 抗体が、clade を超えた R5 HIV-1 の感染をブロックする活性を有することが認められた。この抗血清は、HIV-1R5 ウイルスの感染を著しく抑制したのに対し、HIV-1X4 ウイルスの感染を有意に抑制しなかった。以上の結果は、マウスを用いた実験と一致する結果であった。これらの結果から、cDDR5-MAP は、カニクイサルにおいてもマウスの場合と同様に、CCR5 を認識し HIV-1R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であると考えられる。

1996 年 5 月に coreceptor の発見が報じられて以来、約 1 年後に HIV-1 coreceptor に変異を有するコーカサスの数%の人々は HIV-1 感染に対して抵抗性であることが遺伝子解析の結果判明した。また、イタリアにおけるコホート研究の結果、CCR5 に対する自己抗体保有者はセックスパートナーがエイズ疾患者にもかかわらず、HIV-1 に感染しないことが報告された。さらに、分担研究者らの報告に前後して、健康成人混合血清から CCR5 のペプチドに反応する IgG が HIV-1 の感染を防止したことが報告された。また、産経女性の血清には CCR5 に対する自己抗体が存在し、in vitro で HIV-1 R5 ウイルスの感染を防止することが報告され、CCR5 に対する自己抗体の誘導は HIV-1 R5 ウイルスの感染防止に極めて重要であると考えられる。

E. 結論

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 (Undcapeptidyl Arch, UPA: CXCR4, N₁₇₆VSEADDRYIC; CCR5, R₁₆₉SQKEGLHYTC) に基づく環状環状 dodecapeptide を合成し、multiantigen peptide (MAP) に結合させた免疫抗原を調製した。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。本年度は、よりヒトに近い霊長類であり、AIDS のモデル動物と

して用いたカニクイサルの実験において、分担研究者らは cDDR5-MAP 抗原がサル個体の中で、HIV-1R5 の感染をブロックすることのできる特殊抗体の誘導を明らかにし、さらに、SHIVsf162P3K 株をカニクイサルに静注して challenge した結果、3 頭とも、control に較べて、血中の Viral loads が 2log-3log 低下する感染防御効果がみとめられた。

F. 研究発表

論文

1. Misumi, S., Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S. Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p24gag Peptide. *J. Biochem.* (2004) 135, 447-453
2. Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 20: 297-304, (2004)
3. Misumi, S., Endo, M., Mukai, R., Tachibana, K., Umeda, M., Honda, T., Takamune, N., and Shoji, S. A novel cyclic peptide immunization strategy for preventing HIV-1/AIDS infection and progression. *J. Biol. Chem.* 278:32335-32343. (2003)

G. 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