

200710016A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

**宿主側及びウイルス側要因からみたHIV感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究**

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩本 愛吉

平成20年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 宿主側及びウイルス側要因からみたHIV感染症の病態解明と
新規医薬品・診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究 1
主任研究者 岩本愛吉（東京大学医科学研究所 教授）

II. 分担研究報告

1. CTLエピトープを介した宿主とウイルスの攻防に関する研究 8
東京大学医科学研究所 教授 岩本愛吉
2. HIV感染症の病態進行を左右する宿主因子の探索に関する研究 22
大阪大学微生物病研究所 教授 塩田達雄
3. 中和抗体によるエイズ発症阻止の研究 28
熊本大学エイズ学研究センター 教授 松下修三
4. 非B型HIV-1感染小児のエイズ発症に影響を及ぼす因子に関する研究 33
金沢大学大学院医学系研究科 教授 市村 宏

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 47

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

宿主側及びウイルス側要因からみた HIV 感染症の病態解明と新規医薬品・
診断薬品の開発によるエイズ発症防止の研究

主任研究者 岩本 愛吉
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
感染症研究分野 教授

研究要旨 HIV感染症とその治療に関わる宿主因子として、HLA-Cw*04がネビラピンによる薬疹発症と強く相関していることが明らかになった。HIV-1を抑制する宿主因子のTRIM5αが発現しない状況でも、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAがHIV-1の増殖を阻害することが明らかになった(塩田)。サブタイプにより薬剤耐性の出現パターンが異なる可能性がある(市村)。分子量350前後の低分子化合物中にsCD4に似た立体構造変化を引き起こすものが存在し、しかもV3に対する中和抗体の抗ウイルス効果を増強する機能を持つことを証明できた(松下)。HIV Nefタンパク質由来抗原ペプチド(Nef138-10)を提示したHLA-A*2402分子を特異的に認識する完全ヒト型単クローン抗体を樹立した。HIV由来抗原ペプチドを提示したMHC class I/ペプチド複合体に結合する単クローン抗体を樹立した初めての報告である(岩本)。

分担研究者

塩田達雄 大阪大学微生物病研究所・教授
松下修三 熊本大学エイズ学研究センター
教授
市村 宏 鳥取大学大学院・教授

付ける宿主遺伝子多型を、網羅的手法により明かにする。エイズ病態進行、治療効果やその副作用の個人差を決定する宿主因子が解明できれば、無益な投薬による耐性株の出現を阻止できる。新たな宿主因子が明らかになれば、エイズ制御の新たな分子標的となりうることからその解析を行う(塩田)。ケニアをフィールドに薬剤耐性HIV(非サブタイプB)の遺伝子解析、薬剤耐性ウイルスの母子感染と児の予後、治療効果等への影響、非サブタイプBの予後に関する宿主因子の研究を行う(市村)。20年以上無治療の長期非進行症例で、強力な交差中和活性を持つ症例から、中和単クローン抗体を作成し、発症阻止療法を開発する。また、現在米国で臨床試験を計画している中和抗体、KD247と他薬剤併用療法の基礎を作る(松下)。CTLエピトープにはエスケープ変異だと考えられる定型的な突然変異体が生じやすが、免疫応答の詳細はわかっていない。本研究では、CTLエピトープを認識する単鎖抗体(すでに樹立済み)からより

A. 研究目的

先進工業国においては、抗レトロウイルス療法(ART)が普及し、治療を受けているHIV感染者の予後は著しく改善した。しかし、薬剤耐性ウイルスの問題や薬剤長期服用による毒性がしばしば問題となっている。抗ウイルス薬以外のエイズ発症阻害法の開発は非常に重要な課題である。もちろん、高価な抗HIV薬が購入できない途上国にとっての意義も大きい。本研究は(1)ゲノム情報を駆使した宿主因子の解明、(2)HIVに対する細胞性及び液性獲得免疫の解析とその応用、(3)ケニアやタイ、日本の臨床現場と直結したウイルスと宿主の研究である、ことを特徴とする。より具体的には、感染者毎に大きく異なるエイズ病態進行やARTへの反応の個人差を決定

使いやすいヒト化抗体を作製し、それをツールとして抗原提示の状況を詳細に解析する。また、このエピトープに対する CTL レスポンスの詳細な解析を行う。CTL は急性感染期及び慢性感染期のウイルスコントロールに重要な役割をしていると考えられており、本研究は今後の HIV ワクチン開発にも重要な示唆を与えるものである (岩本)。

B. 研究方法

抗 HIV 薬ネビラピンを使用したタイ国での HIV 感染者の HLA-C の遺伝子型を、ワクナガ MPH-2 HLA タイピング試薬 HLA-C を用いて決定し、臨床経過と比較した。TRIM5 α の発現を抑制した細胞や変異体を発現させた細胞での HIV 感染効果を検討した (塩田)。非 B サブタイプ HIV-1 に感染しているケニアの母子感染児から経時的に採取された血漿中の HIV-1 逆転写酵素遺伝子領域 (*pol*-RT) を RT-PCR で増幅し、直接またはクローニングした後、塩基配列およびアミノ酸配列を解析した (市村)。HIV-1_{JR-FL} 株慢性感染細胞 (PM1/JR-FL) の細胞表面に対する抗体の結合活性を sCD4 または低分子化合物の存在下または非存在下でインキベートし、フローサイトメーター、FACSCalibur (Beckton-Dickinson) にて調べた。取り込んだデータは Cell Quest にて解析した。低分子化合物および sCD4 の gp120 単量体に対する抗体の結合増強効果は gp120-capture ELISA をもちいて検討した。広範囲ウイルス中和抗体 KD-247 を用いて、この抗体の中和感受性の増強効果を 2 種類の異なる synergy 判定法 (Chou and Talalay' s method と 3-Dementional method) で確認した (松下)。組換えバキュロウイルスを用いて単鎖抗体をヒト IgG へと組換え、発現させた。(倫理面への配慮)

HIV-1 感染者の遺伝子解析は平成 13 年に大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得ている (塩田)。ケニア国の医学研究に関する研究審査委員会および倫理審査委員会と金沢大学医学部の倫理委員会の承認を受けている (市村)。

C. 研究結果

HLA-C とネビラピンによる薬疹発症の関係が明らかとなった。Cw*03 は薬疹群で少なく (薬疹群 0.051、対照群 0.158、 $P=0.036$)、Cw*04 は薬疹群で有意に多かった (薬疹群 0.231、対照群 0.053、 $P=0.00057$)。Vero、CV1、LLC-MK 等の旧世界サル細胞で TRIM5 α の発現を抑制した場合、及び SPRY 領域を欠くカニクイサルの TRIM5 α を発現させると HIV-1 感受性が上昇した。旧世界サル細胞では、サイクロフィリン A による HIV-1 感染阻害効果が認められた (塩田)。母子感染児に感染している HIV-1 のサブタイプ (RT 領域) は、A (12 例)、C (2 例)、D (6 例) と CRF02_AG (1 例) であった。ART 抵抗性を示した 4 例は A (2 例) と D (2 例) であった。薬剤耐性関連アミノ酸変異にはチミジン類似体に関連した変異が最も多く見られた (市村)。NBD-556 は CD4i 抗体や抗 V3 抗体の反応に関して、sCD4 存在下と同等の結合増強効果を示すことが観察された。NBD-556 は、sCD4 と異なり単独では JR-FL に対する抗ウイルス能を持たないので、純粋に KD-247 の中和能を高める役割を示したことが分かった (松下)。構築した発現系では、V_H 及び V_L の核酸配列があればヒト IgG を再構成でき、もとの単鎖抗体と同様の抗原特異性をもつヒト IgG を作製することができた。クローン 3 と A24/Nef 複合体の相互作用は、 K_A が 4.22×10^4 (1/M)、 K_D が 2.3×10^{-5} (M) であっ

た。また、クローン27とA24/Nef複合体の相互作用は、 K_A が 5.09×10^4 (1/M)、 K_D が 2.0×10^{-5} (M)であった。特性は保っていたが、樹立した単クローン抗体のA24/Nef複合体への親和力が低いため、感染細胞の染色はできなかった(岩本)。

D. 考察

HLA-Cw*04がネビラピンによる薬疹発症と強く相関していることから、副作用の発現を未然に防ぐことのできる可能性が示唆された。ただし、HLA-Cw0については他のグループの研究結果と違う結果が得られ、さらに検討を要する。TRIM5 α に加え、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAもHIV-1感染を阻害することが明らかになった(塩田)。非サブタイプB型HIVでは、サブタイプB型HIVとは異なるRTI耐性関連アミノ酸変異の出現パターンをとる場合があることが示唆された(市村)。CD4 mimic small compound NBD-556は、sCD4結合時に引き起こされるエンベロープの立体構造変化に似た変化を誘導することが確認できた(松下)。樹立した単離した単クローン抗体におけるCDRに多様性があったことから、*in vitro*において親和性増強を行うことにより、高親和性の単クローン抗体へと最適化できる可能性がある(岩本)。

E. 結論

HLA-Cw*04がネビラピンによる薬疹発症と強く相関していることが明らかになった。TRIM5 α が発現しない状況でも、旧世界サル細胞中ではサイクロフィリンAがHIV-1の増殖を阻害することが明らかになった(塩田)。サブタイプにより薬剤耐性の出現パターンが異なる可能性がある(市村)。分子量350前後の低分子

化合物中にsCD4に似た立体構造変化を引き起こすものが存在し、しかもV3に対する中和抗体の抗ウイルス効果を増強する機能を持つことを証明できた(松下)。HIV Nefタンパク質由来抗原ペプチド(Nef138)を提示したHLA-A*2402分子を特異的に認識する完全ヒト型単クローン抗体を樹立した。HIV由来抗原ペプチドを提示したMHC class I/ペプチド複合体に結合する単クローン抗体を樹立した初めての報告である(岩本)。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song, H, Nakayama, EE, Likanonsakul, S, Wasi, C, Iwamoto A, and Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. International Journal of Immunogenetics. 2007;34:107-13.
- 2) Nuanjun Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Yoshihiro Kitamura, Emi E Nakayama, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Pathom Sawanpanyalert, Aikichi Iwamoto, Tatsuo Shioda, and Koya Ariyoshi. The polymorphisms in *DC-SIGNR* affect the susceptibility to HIV-1 infection. AIDS. Res. Hum. Retrovir. 2007;23:686-92.
- 3) Raphael Lwembe, Washington Ochieng, Annie Panikulam, Charles O. Mongoina, Mary Owens, Yusuke Koizumi, Seiji Kageyama, Naohiko Yamamoto, Tatsuo Shioda, Rachel Musoke, Angel D' Agostino, Elijah M. Songok, Hiroshi Ichimura.

- Anti-Retroviral Drug Resistance-Associated Mutations Among Non-subtype B HIV-1-Infected Kenyan Children With Treatment Failure. *J. Med. Virol.* 2007;79:865-72.
- 4) Masahisa Ohishi, Tatsuo Shioda, and Jun-ichi Sakuragi. Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Virology.* 2007;362:131-8.
- 5) Yusuke KOIZUMI, Seiji KAGEYAMA, Yoshihide FUJIIYAMA, Michiko MIYASHITA, Raphael LWEMBE, Keiki OGINO, Tatsuo SHIODA, Hiroshi ICHIMURA. RANTES -28G delays and DC-SIGN -139C enhances AIDS progression in HIV-1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:713-9.
- 6) Nakayama EE, Carpentier W, Costagliola D, Shioda T, Iwamoto A, Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5alpha show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *Immunogenetics.* 2007 ;59:511-5.
- 7) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. *J Virol.* 2007;81:7280-5.
- 8) Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T. Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *J Virol.* 2007;81:7985-92.
- 9) Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem.* 2007;282:28709-20.
- 10) Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet.* 2007;34:325-335.
- 11) Louisirochanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. Host Genetic Analysis of HIV-1 Subtype CRF01_AE(E)-Infected Thai Patients with Different Rates of Disease Progression. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:1605-1607
- 12) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *Journal of General Virology.* 2008;89:554-66.
- 13) Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa

- A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *Journal of Medical Virology* 80:373-382, 2008.
- 14) Nuanjun Wichukchinda, Emi E Nakayama, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Suthon Vongsheree, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, and Tatsuo Shioda. Effects of *CCR2* and *CCR5* polymorphisms on HIV-1 infection in Thai females. *Journal of AIDS*. in press
- 15) Ken Kono, Haihan Song, Yasuhiro Shingai, Tatsuo Shioda and Emi E. Nakayama. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α against HIV-2 infection. *Virology*. in press
- 16) Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, Masahisa Ohishi, and Tatsuo Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection*. in press
- 17) Nakayama, EE., Shingai, Y., Kono, K. and Shioda, T. TRIM5 α -independent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity mediated by cyclophilin A in Old World monkey cells. *Virology*. In press
- 18) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T. Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 19) Yamada R Ichimura H, et al.: Human papillomavirus infection and cervical abnormality in Nairobi, Kenya, an area with high prevalence of human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol* (in press).
- 20) Kageyama S, Ichimura H, et al.: HIV-2 amino acid substitutions in Gag and Env occurred simultaneously with viral load upsurge in a drug-naïve patient. *J Infect Chemother* (in press).
- 21) Ndembi N, Ichimura H, et al.: Molecular Characterization of HIV-1 and HIV-2 in Yaounde, Cameroon: Evidence of Major Drug Resistance Mutations in Newly Diagnosed non-B Infected Patients. *J Clin Microbiol*, 46(1):177-84, 2008.
- 22) Lwembe R, Ichimura H, et al.: Anti retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1 infected Kenyan children with treatment failure. *J Med Virol* 79(7):865-72, 2007.
- 23) Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Koito A, Murakami T, Matsushita S.: Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate. *J Virol*. 81:3757-3768, 2007
- 24) Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M,

Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita M, Shirasaka T, Kimura S, Oka S.: Successful efavirenz dose reduction in HIV-1-infected individuals with cytochrome P450 2B6*6 and *26. *Clin Infect Dis.* 45: 1230-1237, 2007.

25) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:294-299, 2008.

26) Maeda T., Oyaizu N., Endo T., Odawara T., Nakamura T., Iwamoto A., Fujii T. Pneumocystis jirovecii pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. *European Journal of Radiology*, In Press.

2. 学会発表

1) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5 α s. *Conference for Retrovirus and Opportunistic Infection 2008*, Boston, USA.

2) Matsushita S., Ikeda T, Shibata J., Honda A., Koito K, Yoshimura. Persistence of proviral DNA and the integration sites of HIV-1 in patients on prolonged and effective HAART. *4th IAS Conference on HIV Pathogenesis,*

Treatment and Prevention. Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.

3) Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. *4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention.* Sydney, Australia. June. 22-25, 2007.

4) Nishida, Y., Shibata, J., Kazuhisa, Y., and Matsushita, S.: Broad neutralization against the HIV-1 subtype B panel of reference strains by human monoclonal antibodies established from an HIV-1-infected long-term non-progressor. *8th AIDS Seminar in Kumamoto.* Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.

5) Shibata J, Yoshimura K, Matsushita S. :The single mutation in V2 domain affects quaternary structure of trimer gp120 and dramatically increases the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralizing antibodies. *8th AIDS Seminar in Kumamoto.* Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.

6) Hatada, M., Yoshimura K, Shibata J, Matsushita S. HIV-1BaL mutants escaping neutralization from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody KD-247. *8th AIDS Seminar in Kumamoto.* Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.

7) Yoshimura, K., Shibata, J., Honda A., Tamamura, H., and Matsushita S.: A potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247 shows favorable synergism with other antiretrovirals, sCD4 and CD4 mimic small compound in vitro. *8th AIDS Seminar in Kumamoto.* Sep 13-14, 2007. Aso, Kumamoto.

8) Matsushita S. :Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD-247: implications for passive immunotherapy. *Tentative Program for the 3rd Japan-Germany HIV/AIDS Symposium.* Nov. 26, 2007.

Hiroshima.

9) Matsushita S., Nishida, Y., Shibata J., Honda A., Yoshimura, K: Broad cross-neutralization mediated by combination of anti-V3 and CD4 binding site antibodies in an HIV-1 infected patient with long-term non-progressive disease. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA

10) Yoshimura, K, Shibata J., Honda, A., Yamada, Y., Nasuo, H., Tamamura, H., Matsushita S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a low-molecular CD4 mimic compound, N-(4-Chlorophenyl)-N'-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-oxalamide (NBD-556). 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Feb. 3-6, 2008, Boston, USA.

11) Nunoya J., Nakashima T., Kawana-Tachikawa A., Ito Y., Sugimura K., and Iwamoto A. Generation of monoclonal antibodies cross-reactive for the wild type and an escape mutant of an immunodominant CTL epitope. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention, Sydney, Australia July 22-25, 2007

12) 中山英美、塩田達雄。サイクロフィリン A の HIV-1 感染阻害効果。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

13) 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

14) 大石真久・櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 のゲノム二量体化とウイルス粒子成熟との相関に関する研究 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌。

15) 櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1 ゲノム組換え標的の必要条件に関する解析 第 21 回日本エイズ学会学術集会、広島。

16) 松下修三、西田吉辰、柴田潤二、畑田万紀子、吉村和久：長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 I；中和単クローン抗体の作成と解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。2007.11.28-11.30. 広島。

17) 西田吉辰、柴田潤二、吉村和久、松下修三：長期非進行症例 (LTNP) における交叉中和のメカニズムの研究 II；中和単クローン抗体の subtype B panel に対する交叉中和活性。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。2007.11.28-11.30. 広島。

18) 畑田万紀子、吉村和久、柴田潤二、松下修三：強力な抗 HIV-1 gp120-V3 抗体 KD-247 に対する HIV-1BaL の中和逃避のメカニズム解析。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。2007.11.28-11.30. 広島。

19) 柴田潤二、吉村和久、松下修三：中和抗体高度抵抗性ウイルスを感受性にする変異は gp120 三量体構造に影響を与える。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。2007.11.28-11.30. 広島。

20) 吉村和久、柴田潤二、畑田万紀子、山田裕子、増野弘幸、玉村啓和、松下修三：CD4 mimic small compound と anti-HIV monoclonal antibody のウイルス中和における相乗効果。第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会。2007.11.28-11.30. 広島。

21) 布矢純一、立川(川名)愛、岩本愛吉 HIV 由来抗原ペプチドを提示した MHC class I/ペプチド複合体と特異的に結合する単クローン抗体の作製。日本ウイルス学会、札幌、October 21-23, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

CTL エピトープを介した宿主とウイルスの攻防に関する研究

分担研究者 岩本 愛吉
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
感染症研究分野 教授

研究要旨 HIV Nef タンパク質由来抗原ペプチド(Nef138)を提示したHLA-A*2402分子を特異的に認識する単鎖抗体を基にして完全ヒト型単クローン抗体を樹立した。HIV 由来抗原ペプチドを提示したMHC class I/ペプチド複合体に結合する単クローン抗体を樹立した初めての報告である。このような単クローン抗体を用いた細胞染色を行うことにより、HIV 特異的な抗原提示を直接的に解析できることが期待される。一方で、本研究で樹立した単クローン抗体は、HIV 感染細胞に特異的に発現している抗原と結合するものであることから、抗体治療への応用も期待できる。こういった研究に応用するため、今後より高い親和性を持った単クローン抗体へと最適化することが必要である。

A. 研究目的

HIVが発見されて25年経過したが、ワクチン開発のめどは立っていない。HIV 特異的な免疫反応を詳細に解明することが急務である。細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は急性感染期及び慢性感染期のウイルスコントロールに重要な役割をしているが、HIVはエスケープ変異を起こし、CTLの選択圧から容易にのがれてしまう。そこで、CTLによる抗原認識を詳細に解析するため、本研究では、抗原提示側に焦点を当てることとした。CTLに対しては、主要組織適合抗原(MHC)分子の上に結合したHIV由来のペプチドの複合体(p-MHC)として抗原提示がなされる。本研究では、日本人の約70%が発現するHLA-A24拘束性のp-MHCに特異的な単クローン抗体を作製し、細胞表面に提示される抗原量等の解析を行うことを目的とする。われわれの研究室ではファージディスプレイ・ライブラリーから単鎖抗体をすでに樹立している。単鎖抗体は、蛍光ラベルや多量体化などその後の用途に応じた分子改変が難しいため、本年度の研究では、これまでに単離した単鎖抗体をヒト化することを

的とした。

B. 研究方法

組換えヒト免疫IgGの作製

組換えバキュロウイルスを用いた組換えヒトIgG発現系を構築するため、単離した単鎖抗体のV_H及びV_L領域を組換えることによりヒトIgGを発現できるようにするため、pFastBac Dual(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)上にヒトIgG発現カセットを構築した。pFastBac Dualは組換えバキュロウイルス作製において、挿入遺伝子のDonor plasmidとなる。ヒトIgG発現カセットを含むDonor plasmidの構築方法の概略図を図1に示した。L鎖発現カセットを得るために、pAc- \cdot -CH3(PROGEN, Heiderberg, Deutsuland)及びpAc- \cdot -CH3(PROGEN, Heiderberg, Deutsuland)をBg/IIIで消化した後、得られたDNA断片をDNA blunting Kit(TAKARA, Shiga, Japan)を用いて平滑末端化した。次に、pFastBac DualをSphI及びXhoIで消化した後、DNA blunting Kitを用いて平滑末端化した。プラスミドの自己環状化を防

ぐため、Alkaline phosphatase, shrimp (Roche, Basel, Switzerland)で脱リン酸化した後、両者をライゲーションした。これにより、pFastBac Dual/C ・及び pFastBac Dual/C ・を得た(図 1(A))。

次に、H鎖発現カセットを得るために、pAc・-CH3 を *Bam*HI で消化した後、得られた DNA 断片を DNA blunting Kit を用いて平滑末端化した。次に、pFastBac Dual を *Bam*HI 及び *Hind*III で消化した後、DNA blunting Kit を用いて平滑末端化した。プラスミドの自己環状化を防ぐため、Alkaline phosphatase, shrimp で脱リン酸化した後、両者をライゲーションした。これにより、pFastBac Dual/CH を得た(図 1(B))。pFastBac Dual/C ・、pFastBac Dual/C ・及び pFastBac Dual/CH を *Pac*I 及び *Mfe*I で消化した後、H鎖発現カセットを含む DNA 断片を pFastBac Dual/C ・及び pFastBac Dual/C ・にそれぞれライゲーションした。これにより免疫グロブリン発現プラスミド pFastBac Dual/C ・ CH 及び pFastBac Dual/C ・ CH を得た(図 1(C))。得られたプラスミドは全て塩基配列決定を行った後、正しい配列を持つクローンを以降の実験に用いた。

次に、ファージディスプレイライブラリーから単離した単鎖抗体の V_H 及び V_L を組み込むため、単鎖抗体をコードするファージミドを鋳型として PCR により制限酵素配列を付加させた(図 2(A))。94℃ 1分、[94℃ 30秒、35℃ 30秒、72℃ 30秒]×5 サイクル、[94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒]×25 サイクル、72℃ 7分、4℃ ∞の PCR を行い、ExTaq ポリメラーゼを用いて DNA 断片を増幅させた。用いたプライマーを以下に示した。

VH-S-1 : 5' - TCTCGAGATGGCCCAGG -3'
(17mer)

VL-S-2 : 5' - TGAGCTCCAGCCTGTGC -3'
(17mer)

VH-AS-1 : 5' - TGCTAGCTGAGGAGACGG -3'
(18mer)

VL-AS-1 : 5' - TAAGCTTACCTAAAACG -3'
(17mer)

増幅させた DNA 断片は、Wizard Miniprep DNA Purification System を用いて精製した後、pGEM-T Vector Systems を用いて pGEM-T ベクターにライゲーションした。コンピテントセル (JM109) をトランスフォーメーションした後、得られた単一コロニーを 100 ・ g/mL アンピシリンを加えた 2×YT 培地を用いて 37℃ で一晩震盪培養した。プラスミド DNA を QIAprep Miniprep Kit を用いて抽出した後、制限酵素消化して挿入 DNA 断片を確認した。塩基配列決定を行い、正しい配列を持ったクローンのみを以降の実験に用いた。 V_H 断片が挿入されているプラスミドの場合は *Xho*I 及び *Nhe*I、 V_L 断片が挿入されているプラスミドの場合は *Sac*I 及び *Hind*III で消化した。アガロースゲル電気泳動を行ったあと、QIAEX II を用いて目的の DNA 断片を単離した。 V_H 断片を挿入するため、pFastBac Dual/C ・ CH あるいは pFastBac Dual/C ・ CH を *Xho*I 及び *Nhe*I、 V_L を *Sac*I 及び *Hind*III で消化し、 V_H 及び V_L 断片を順次挿入して Donor plasmid を得た(図 2(B))。

次に、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を用いて、組換えバキュロウイルスの作製を行った。作製方法の概略を図 3 に示した。得られた Donor plasmid を用いて大腸菌 DH10Bac 株 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) をトランスフォーメーションし、IPTG 及び X-gal を塗布した LB/GT プレー

ト (50 · g/mL カナマイシン、7 · g/mL ゲンタマイシン、50 · g/mL テトラサイクリンを含む LB プレート) に塗布し、37°C で 48 時間培養した。単一コロニーを白金耳で取り、50 · · 1 の 2×YT に懸濁させた。白金耳を用いて、IPTG 及び X-gal を塗布した LB/GT プレート (50 · g/mL カナマイシン、7 · g/mL ゲンタマイシン、50 · g/mL テトラサイクリンを含む LB プレート) にストリーキングし、37°C で一晩培養した。白色で完全に分離された単一のコロニーを以降の実験に用いた。

組換え Bacmid を単離するため、ミニプレップを行った。LB/KGT (50 · g/mL カナマイシン、7 · g/mL ゲンタマイシン、50 · g/mL テトラサイクリンを含む LB 培地) に単一コロニーを加え、37°C で一晩震盪培養した。1.5mL の培養液を遠心 (15000rpm、室温、1 分) して大腸菌を沈殿させた後、上清を完全に除いた。300 · l の Solution I (15mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、100g/mL RNase A) を加えて、沈殿を懸濁させた。300 · l の Solution II (0.2N NaOH、1% SDS) を加えて、転倒混和した。室温で 5 分間インキュベーションした後、300 · l の Solution III (3M 酢酸ナトリウム (pH5.5)) を加え、転倒混和した。氷上で 10 分間インキュベーションした後、遠心 (15000rpm、室温、10 分) した。750 · l の上清を移し、750 · l のイソプロパノールを加えて転倒混和した。氷上で 10 分間インキュベーションした後、遠心 (15000rpm、室温、15 分) した。上清を捨てた後、500 · l の 70% エタノールを加えて転倒混和した。遠心 (15000rpm、室温、5 分) した後、沈殿を風乾させた。乾燥後、沈殿を 60 · l の 1×TE (pH8.0) に溶解した。得られた DNA 溶液は、4°C で保存した。組換え Bacmid の単離はアガロースゲル電気泳動にて確認した。

また、組換え Bacmid 上に挿入遺伝子が転移されているか PCR で確認した。93°C 3 分、[94°C 45 秒、55°C 45 秒、72°C 5 分] × 30 サイクル、72°C 7 分、4°C ∞ の PCR を行い、ExTaq ポリメラーゼを用いて DNA 断片を増幅させた。用いたプライマーを以下に示した。

M13-For : 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC -3'
(17mer)

M13-Rev : 5' - CAGGAAACAGCTATGAC -3'
(17mer)

Cellfectin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を用いて、単離した組換え Bacmid を Sf9 細胞へトランスフェクションした。Sf9 細胞を 9×10^5 細胞/well で 6 well プレートに撒き、27°C で 3 時間培養して接着させた。1 · g の Bacmid DNA 及び 6 · l の Cellfectin を Sf 900 II で希釈して 100 · l にした後、室温で 30 分インキュベートしてトランスフェクション溶液を調整した。培養した細胞から培地を除き、2mL の Sf 900 II で一回洗った。上記のように調整したトランスフェクション溶液を加えて、27°C で 5 時間インキュベートした。培地を除き、2mL の Sf 900 II を加えて、27°C で 72 時間インキュベーションした。遠心 (1500rpm、室温、5 分) した後、上清を 0.2 · m のフィルターに通した。得られたウイルス液は、500 · · 1 ずつ分注して -80°C で保存した。これを P1 ウイルスとした。高力価のウイルスを得るために、Sf9 細胞でさらに増殖させた。Sf9 細胞を 9×10^5 細胞/well で 6 well プレートに撒き、27°C で 3 時間培養して接着させた。Sf 900 II で 5 倍に希釈した P1 ウイルス液を Sf9 の培養液に加え、27°C で 96 時間インキュベーションした。培養上清を上記と同様の方法で回収し、-80°C で保存した。これを P2 ウイルス液とした。

ウイルスの力価は、BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit(Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)を用いて測定した。次に、高力価のウイルスを大量に得るために、得られたウイルスを Sf9 細胞で増殖させた。 1×10^6 細胞/mL になるように Sf9 細胞をスピナー培養した。MOI=0.1 になるように P2 ウイルス液を加え、27°C で 96 時間スピナー培養した。遠心(1500rpm、室温、5 分)した後、上清を 0.2 \cdot m のフィルターに通した。得られたウイルス液は 4°C で保存し、これを以降の実験に用いた。免疫グロブリンの発現は、ELISA 及び還元及び非還元条件でのウェスタンブロッティングにより確認した。

組換え免疫グロブリンを得るために、High Five 細胞に作製したバキュロウイルスを感染させ、培養上清から組換え免疫グロブリンを精製した。 1×10^6 細胞/mL になるように High Five 細胞をスピナー培養した。MOI=5 になるようにウイルス液を加え、27°C で 72~120 時間スピナー培養した。遠心(1500rpm、室温、5 分)した後、上清に最終濃度 0.02% になるように Tween 20 を加えた。0.2 \cdot m のフィルターに通したものを試料として用いた。

組換え免疫グロブリンの精製は Protein A を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。まず、AKTAexplorer 10S システムに 1mL の Hi-Trap Protein A カラム(GE healthcare Bio-science Corp., Piscataway, NJ) を接続し、Starting Buffer (0.1M Na-phosphate Buffer, pH7.4) 10ml をカラムに流して平衡化した。上記のように調製した試料を Pump P-960 を用いて添加した後、Starting Buffer 20ml をカラムに流して、平衡化した。その後、Elution Buffer(0.1M グリシン-塩酸, pH2.0)により、流速 1ml/分、4°C

の条件で 5 分かけて pH 勾配を行い、溶出させた。溶出してきた各フラクションを 1ml ずつ分取し、100 \cdot l の 1M TrisHCl (pH9.0) で直ちに中和した。

精製度は、還元及び非還元条件での SDS-PAGE を行った後、CBB 染色することで確認した。溶出フラクション(2~3mL) をまとめて、PD-10 カラム用いて PBS(-)に溶液交換した。溶液交換後のタンパク質溶液を Amicon Ultra を用いて濃縮した。タンパク質の定量は、280nm の吸光度測定することで行い、濃度は次式に従い計算した。免疫グロブリン濃度(mg/mL) = 吸光度(280nm, 1cm 光路長セル) \times 1.35(免疫グロブリンの分子吸光係数)。精製した組換え免疫グロブリンは、-80°C で保存した。

表面プラズモン共鳴法による抗原抗体反応の解析

表面プラズモン共鳴法を用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。Amine Coupling Kit(Biacore, Uppsala, Sweden)を用いて、Research grade CM5 sensor chip(Biacore, Uppsala, Sweden)に抗ヒト IgG Fc 抗体 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)を約 3700 レゾナンスユニット(Resonance Unit, RU)固定化した。精製した A24/Nef 複合体に特異的に結合する組換えヒト IgG をチップ上に送液し、約 1200RU 捕捉させた。次に、1/10 量の NSB Reducer(Biacore, Uppsala, Sweden)を含む、段階希釈させた A24/Nef 複合体あるいは A24/Env 複合体を含む溶液を作製した。これらの溶液を 3 分間送液した後、抗原を含まない緩衝液を 3 分間送液した。一つの濃度点における全ての送液が終わった段階で、10mM グリシン-塩酸緩衝液(pH1.5)を 30 秒間、

3 回送液し、チップを再生させた。抗原抗体相互作用の解析は、流速 $20 \cdot \text{l}/\text{min}$ 、 25°C の条件下で、HBS-EP 緩衝液 (10mM HEPES、 150mM NaCl、 3mM EDTA、 0.05% Tween 20 (pH7.4)) を用いて行った。また、抗原及び抗体の希釈は、全て HBS-EP 緩衝液を用いて行った。リファレンスセルには、ヒト IgG (SIGMA, St. Louis, MO) を捕捉させたチップを用いた。得られた結果は、BIAevaluation (Biacore, Uppsala, Sweden) プログラムを用いて解析した。

C. 研究結果

組換え免疫グロブリンの作製

真核細胞の発現系である組換えバキュロウイルスの発現系を用いて、単離した単鎖抗体の可変領域を持ったヒト免疫グロブリンの作製を行った。組換えバキュロウイルス感染細胞の培養上清から Hi-Trap Protein A カラムを用いてヒト免疫グロブリンを精製した。精製度は、SDS-PAGE 後に CBB 染色することにより確認した (図 4)。カラムに結合させたヒト免疫グロブリンを pH 勾配により溶出したところ、pH5 付近で溶出した (フラクション 10 及び 11)。また、非還元条件での SDS-PAGE では約 150kDa 、還元条件での SDS-PAGE では約 50kDa と約 30kDa のバンドが確認された。これらの結果から、ヒト免疫グロブリンを精製できたことが分かった。

次に、作製した免疫グロブリンが、単離した単鎖抗体と同様の特異性を有するかを ELISA により解析した (図 5)。単鎖抗体クローン 27 あるいはクローン 3 に由来する可変領域を持った免疫グロブリンは、解析した各濃度において、BSA 及び A24/Env に結合しなかった。一方、A24/Nef 複合体に濃度依存的に結合した。従って、作製したヒト免疫グロブリンは、単鎖抗体と同様の抗原特異性を有して

いることが分かった。

表面プラズモン法による抗原抗体反応の解析

Biacore 1000 を用いて、抗原抗体反応の解析を行った結果を図 6 及び 7 に示した。アミンカップリング法により、抗ヒト IgG Fc 抗体をセンサーチップに固定化した。次に、作製したヒト IgG (クローン 3 及び 27) をチップ上に捕捉させ、リガンドとした。A24/Nef 複合体をアナライトとして用い、 $10 \cdot \text{M}$ 、 $5 \cdot \text{M}$ 、 $2.5 \cdot \text{M}$ 、 $1.25 \cdot \text{M}$ 、 $0.625 \cdot \text{M}$ において、 25°C における抗原抗体反応を解析した。クローン 3 を用いて得られたセンサーグラムを図 6(A) に、クローン 27 を用いて得られたセンサーグラムを図 29(A) に示した。また、図 6(B) 及び図 7(B) に、Req 値をアナライト濃度に対してプロットした結果を示した。Req 値をアナライト濃度に対してプロットすると、直線性を示した。この結果から、BIAevaluation (version 3.0) を用いて、 K_A 及び K_D を算出した。図 8 に算出した K_A 及び K_D を示した。クローン 3 と A24/Nef 複体の相互作用は、 K_A が 4.22×10^4 ($1/\text{M}$)、 K_D が 2.3×10^{-5} (M) であった。また、クローン 27 と A24/Nef 複体の相互作用は、 K_A が 5.09×10^4 ($1/\text{M}$)、 K_D が 2.0×10^{-5} (M) であった。

D. 考察

ファージディスプレイ法を用いることにより、種々の抗原に対するヒト由来の単鎖抗体や Fab が単離されている。ヒト型抗体は、ヒト個体内に投与しても、抗体そのものに対して免疫応答が誘導されない。そのため、ヒト単クローン抗体は治療などに対して有効である。しかしながら、ヒト単クローン抗体を組換え技術以外の方法を用いて作製するのは難しい。また、単鎖抗体や Fab は定常領域を持たないため、免疫グロブリンのもつエフェク

ター機能が得られない場合がある。さらに、ファージディスプレイ法で得られる単鎖抗体や Fab は、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けていないため、完全なヒト型の抗体とは異なる。そこで、真核細胞の発現系であるバキュロウイルス発現系を用いて IgG 化を試みた。構築した発現系では、 V_H 及び V_L の核酸配列があればヒト IgG を再構成でき、もとの単鎖抗体と同様の抗原特異性をもつヒト IgG を作製することができた。本研究で確立した一連の実験系を用いることにより、迅速にヒト IgG の単クローン抗体を作製できると考えられる。

バキュロウイルス発現系を用いて作製したヒト IgG 単クローン抗体を用いて、抗原との相互作用を解析した。一般的に、単クローン抗体の抗原に対する親和力は、 K_D で $10 \sim 0.1$ nM 程度であるといわれている。本研究で樹立した単クローン抗体は、これに比べて抗原への親和力が低かった。樹立した単クローン抗体は、MHC class I/ペプチド複合体のペプチド収容溝を形成している H 鎖の $\cdot 1$ 及び(または) $\cdot 2$ ドメインと提示された抗原ペプチドによりなる立体構造を認識していると考えられる。また、MHC class I/ペプチド複合体に対する TCR の親和力は $1 \sim 90 \cdot M$ であり、本研究で樹立した単クローン抗体の親和力に近い。このような複数のドメインを認識して特異性を決定している TCR や単クローン抗体は、親和力が低いのかもしいない。また、本研究で用いた非免疫ヒト由来ライブラリーには、IgM 由来可変領域で作製されたライブラリーが含まれている。IgM は、可変領域に体細胞高頻度突然変異が起こっていないため、IgG よりも抗原への親和力が低いが、特異性の異なるクローンが IgG よりも多く含まれていると考えられる。それゆえ、樹立した単クローン抗

体の可変領域は、IgM に由来しているのではないかと考えられた。また、樹立した単離した単クローン抗体における CDR に多様性があったことから、*in vitro* において親和性増強を行うことにより、高親和性の単クローン抗体へと最適化できると考えられた。

また、HIV 感染細胞や Nef タンパク質を発現させた細胞を用いた細胞染色では、これらの細胞を染色することは出来なかった。これまで、1 つの細胞で提示されている CTL エピトープの数は、マススペクトロメトリー及び Cr release assay を用いて推定されてきた。HIV 感染の場合では、Gag タンパク質、逆転写酵素、Nef タンパク質由来の抗原ペプチドについて、分子数が推定されているが、数十～数千個と非常に少ない。また、これまで広く用いられている蛍光物質とフローサイトメーターあるいは蛍光顕微鏡を組み合わせた方法を用いると、1 細胞当たり $100 \sim 1000$ 程度の分子が検出限界である。さらに、表面プラズモン共鳴法を用いた抗原-抗体相互作用の解析から、本研究で樹立した単クローン抗体は、一般的な単クローン抗体の親和力よりも非常に低かった。従って、細胞表面において提示されている A24/Nef 複合体の数が少ないということと、樹立した単クローン抗体の A24/Nef 複合体への親和力が低いということが染色できなかった理由として考えられる。一方で、ナノクリスタルと全反射蛍光顕微鏡を組み合わせた蛍光染色方法は、1 分子に由来する蛍光シグナルを高感度に検出できるシステムとして知られてきている。また、抗体の多価分子化による親和力の増強あるいは変異導入による親和力の増強を行うことで、高親和性の単クローン抗体を作製できる。従って、このような方法を組み合わせることによ

り、HIV 感染細胞などの染色も可能になるであろうと考えられる。

E. 結論

本研究により、HIV Nef タンパク質由来抗原ペプチド(Nef138)を提示した HLA-A*2402 分子を特異的に認識する完全ヒト型単クローン抗体を樹立した。HIV 由来抗原ペプチドを提示した MHC class I/ペプチド複合体に結合する単クローン抗体を樹立した初めての報告である。このような単クローン抗体を用いた細胞染色を行うことにより、HIV 特異的な抗原提示を直接的に解析できる。例えば、抗原提示細胞あるいはウイルス感染細胞の細胞表面に何分子の CTL エピトープが提示されているか、どのような抗原提示細胞が抗原提示を行っているか、細胞内で CTL エピトープがどのように産生され輸送されるか、などを解析できる。このような単クローン抗体を用いた細胞染色による解析方法は、これまで行われてきたマスマスペクトロメトリーなどの方法と違い、細胞を生きたままで解析できることから有用であると考えられる。また、HIV は変異が多いウイルスであり、CTL 選択圧下において、患者個体内において抗原ペプチドのアミノ酸配列に変化が生じることが知られている。1 つの細胞の細胞表面に提示されている変異型抗原ペプチドと野生型抗原ペプチドを定量することにも応用できると考えられる。一方で、本研究で樹立した単クローン抗体は、HIV 感染細胞に特異的に発現している抗原と結合するものであることから、抗体治療への応用も期待できる。こういった研究に応用するため、今後より高い親和性を持った単クローン抗体へと最適化することが必要であると考えられた。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T. Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S., and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:686-692, 2007.
- 3) Song, H., Nakayama, E.E., Likanonsakul, S., Wasi, C., Iwamoto, A., and Shioda, T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. *International J. Immunogenetics* 34:107-113, 2007.
- 4) Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., and Theodorou, I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5 α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. *International J. Immunogenetics* 59:511-515, 2007.
- 5) Liu, H., Nakayama, E.E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *International J. Immunogenetics*. 34:325-335, 2007.
- 6) Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T.,

Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. *J. Medical Virology*, 80:373-382, 2008.

7) Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jirovecii pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. *European Journal of Radiology*, In Press.

2. 学会発表

1) Nunoya J., Nakashima T., Kawana-Tachikawa A., Ito Y., Sugimura K., and Iwamoto A. Generation of monoclonal antibodies cross-reactive for the wild type and an escape mutant of an

immunodominant CTL epitope. 4th IAS Conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention, Sydney, Australia July 22-25, 2007

2) 布矢純一, 立川(川名)愛, 岩本愛吉 HIV 由来抗原ペプチドを提示した MHC class I/ペプチド複合体と特異的に結合する単クローン抗体の作製。日本ウイルス学会, 札幌, October 21-23, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特許取得なし

2. 実用新案登録
登録なし

3. その他
なし

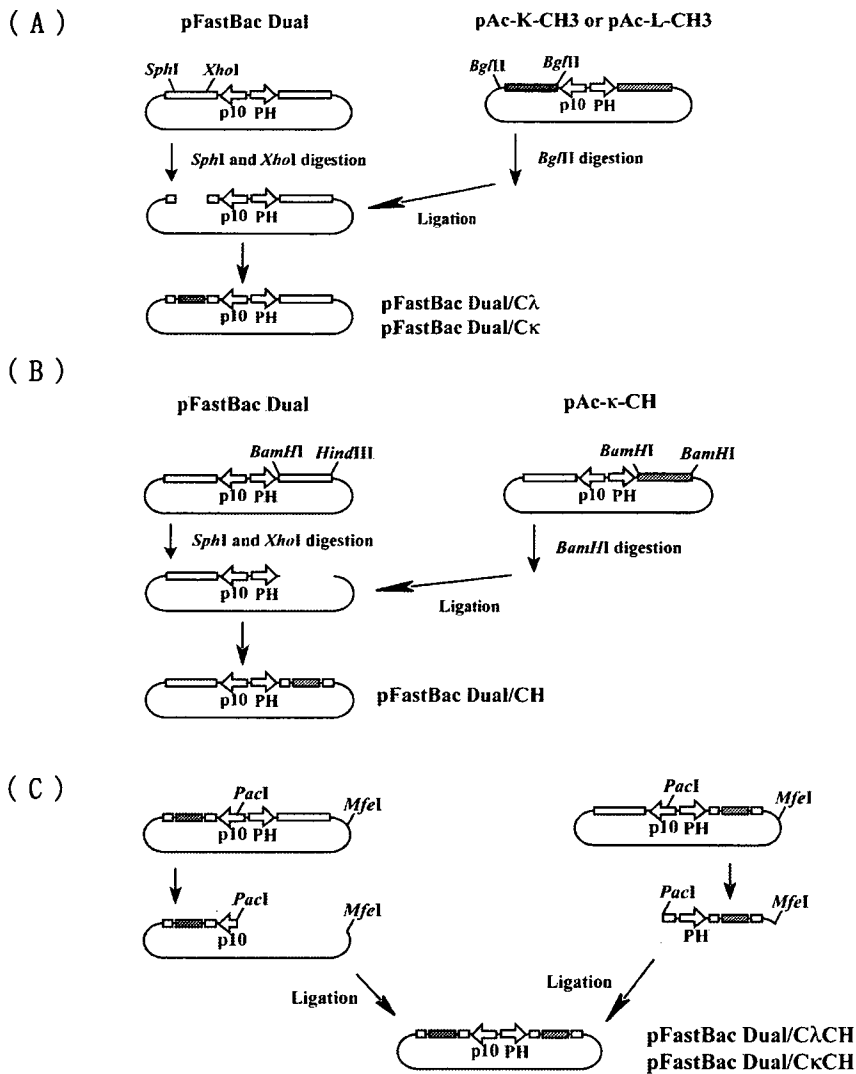


図1. 免疫グロブリン発現カセットを含むDonor plasmidの構築

(A) pFastBac Dual/C λ 及びpFastBac Dual/C κ の作製

L鎖発現カセットをpFastBac Dualのp10プロモーターの下流に挿入した。

(B) pFastBac Dual/CHの作製

H鎖発現カセットをpFastBac DualのPHプロモーターの下流に挿入した。

(C) pFastBac Dual/C λ CH及びpFastBac Dual/C κ CHの作製

H鎖発現カセットを含む領域を組み換えて、H鎖及びL鎖を含むDonor plasmidを構築した。

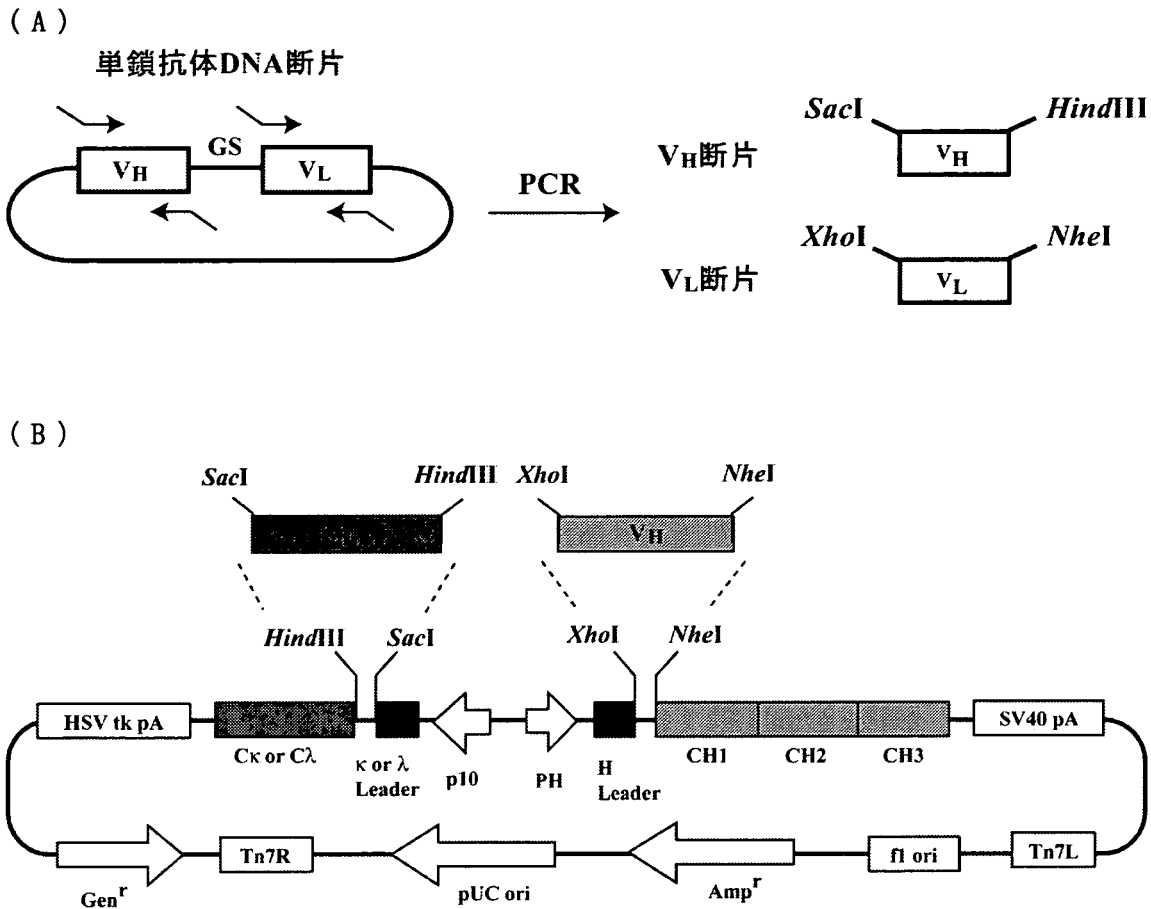


図2. 可変領域断片の作製と Donor plasmid への挿入

(A) 可変領域断片の作製

単鎖抗体DNA断片が挿入されたプラスミドを鋳型として、PCRにより Donor plasmidに挿入するDNA断片を作製した。
 V_L 断片は *SacI* 及び *HindIII*、 V_H は *XhoI* 及び *NheI* を用いて、Donor plasmidに挿入することができる。

(B) 可変領域断片の Donor plasmid への挿入

構築した免疫グロブリン発現カセットを含む Donor plasmid は、 V_H 及び V_L を組換えることにより、単鎖抗体あるいは Fab と同一の可変領域配列を持ったヒト免疫グロブリンを作製できる。H鎖は PH プロモーター、L鎖は p10 プロモーターにより制御されている。

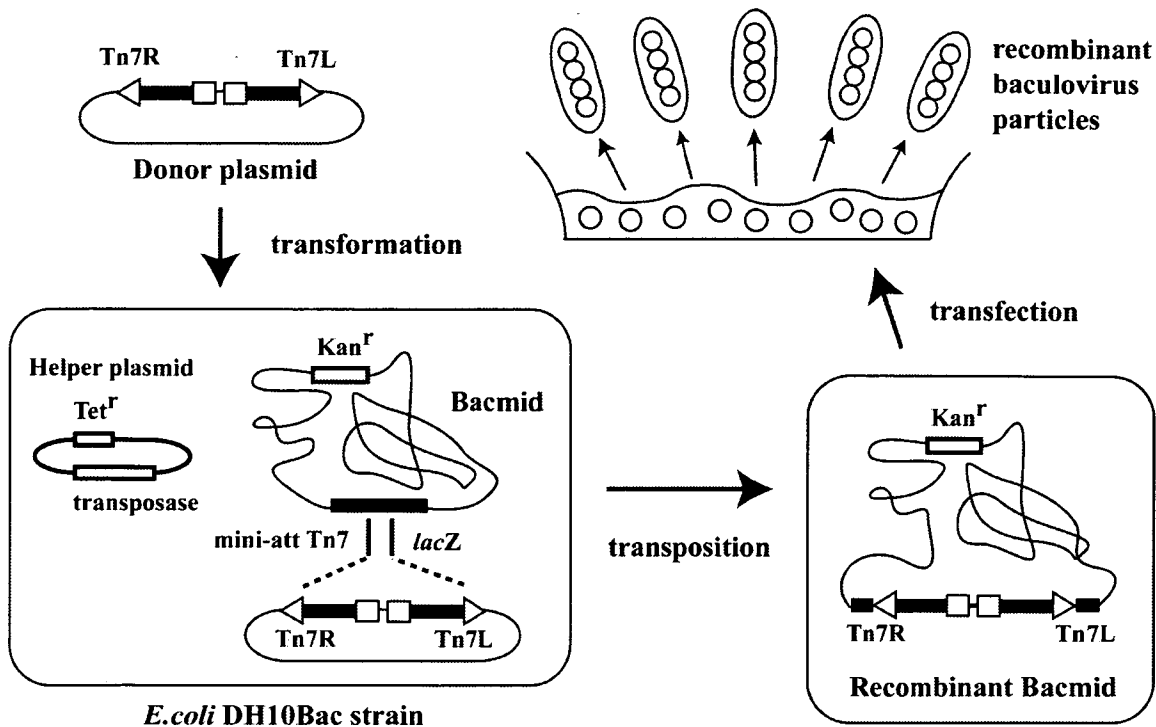
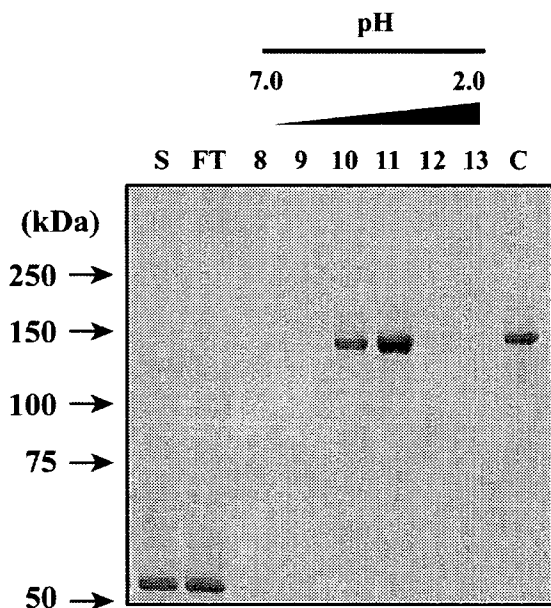


図3. 組換えバキュロウイルスの作製

大腸菌 DH10Bac 株は、バキュロウイルスゲノムを含むプラスミドである Bacmid 及びトランスポゼースをコードしたプラスミドが導入されている大腸菌株である。構築した Donor plasmid を大腸菌 DH10Bac 株に導入すると、転移反応が起こり、Donor plasmid の挿入遺伝子断片を含む領域が、Bacmid 上に転移される。組換えが起こった Bacmid は抗生物質による選択が出来る。得られた組換え Bacmid を昆虫細胞にトランスフェクションすることにより、組換えバキュロウイルスを作製することができる。

(A)



(B)

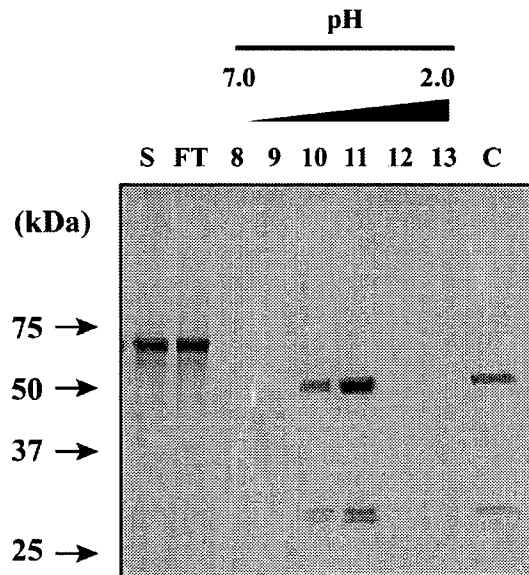


図4. 組換え免疫グロブリンの精製

組換えバキュロウイルスを感染させた High Five 細胞の培養上清から、Hi-Trap Protein A カラムを用いて組換え免疫グロブリンを精製した。SDS-PAGE を行い、CBB 染色した結果を示した。S は精製前の培養上清、FT はフロースルー分画、8~13 は溶出フラクション、C はカラムから溶出した後、溶液交換及び濃縮を行い得た試料を SDS-PAGE させた。

(A) は非還元条件、(B) は還元条件での SDS-PAGE を行った結果を示した。