

200908012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(政策創薬総合研究事業)

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づく

エイズワクチン戦略の再構築

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上野 貴将

平成22(2010)年3月

**厚生労働科学研究費補助金**

**創薬基盤推進研究事業**

**(政策創薬総合研究事業)**

**ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づく**

**エイズワクチン戦略の再構築**

**平成21年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 上野 貴将**

**平成22(2010)年3月**

# 目 次

## I. 総括研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築 .....	1
研究代表者 上野 貴将 (熊本大学エイズ学研究センター 准教授)	

## II. 分担研究報告書

1. ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析 .....	5
上野 貴将 (熊本大学エイズ学研究センター 准教授)	
2. 抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用 .....	11
熊谷 泉 (東北大学大学院工学研究科 教授)	
3. プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析 .....	15
荒木 令江 (熊本大学大学院生命科学研究部 准教授)	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	21
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	25
-----------------------	----

# I . 総括研究報告書

総括研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築

研究代表者	上野貴将	熊本大学エイズ学研究センター	准教授
研究分担者	熊谷 泉	東北大学大学院工学研究科	教授
	荒木令江	熊本大学大学院医学薬学研究部	准教授

研究要旨

ヒトの HIV 感染に伴って提示される細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 抗原の包括的な解析を目指して、新たな蛋白化学的アプローチの基盤システム立ち上げを目指した。その結果、本年度は以下の成果を得た。(1) HIV 特異的 CTL の抗ウイルス機能は、抗原特異性によって大きく異なり、CTL の優れた抗ウイルス活性発現には、ターゲットとする抗原ペプチドが HLA クラス I 複合体と安定な複合体を形成し、ウイルス感染細胞の表面上に長時間にわたって提示されることが重要であること、(2) 昨年までに CDR グラフティングにより作製した TCR グラフト Fv, scFv 断片を、さらに IgG 構造に組み込むことによって、機能を保持したまま、構造の安定化を達成できたこと、(3) 新たな高感度同定定量法としての iTRAQ-MRM 法を考案し、本法の生体サンプルへの応用へ向けての最適化を行った結果、1-10 att mol の感度で生体内ペプチドを検出同定可能な効率よいシステムを立ち上げたことの3点である。

A. 研究目的

ヒト感染免疫系に関する基盤情報は非常に限られており、エイズワクチン開発の障壁となっている。中でも抗原提示に関わる分子群は動物種間で大きく異なるため、ヒト検体での情報の充実化が望まれている。本研究では、プロテオームを主体とした新しい蛋白化学的アプローチを確立して、ヒトで提示される極微量の HIV 抗原を包括的に明らかにすることにより、エイズワクチン開発と厚生労働行政に貢献することを目指している。

B. 研究方法

(1) さまざまな病態にある HIV 感染者から提供していただいた血液検体 (国立国際医療センター・岡先生の協力の下) を用いて、CTL の抗原特異性と抗ウイルス機能を解析した。さらに T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解

析した。

(2) T 細胞レセプター (TCR) の相補性決定領域 (CDR) を抗体可変領域断片のフレームワーク領域へ移植する構造分子モデリングを構築し、TCR グラフト抗体をデザインした。これを IgG 発現ベクターにさらに組み込み、TCR グラフト IgG 発現系を構築した。培養細胞に遺伝子導入して組換え IgG を発現させるとともに、精製して、フローサイトメトリーなどを用いた機能解析に供した。

(3) 質量分析を用いた解析には、3台の高感度タンデム質量分析計、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置 (nanoLC) , 解析ソフト (AnalystQS, AnalystMRM, MRM pilot, MRM quant, scheduled MRM program, GPS, ProteinPilot, MASCOT 等) を用いた。高感度タンデム質量分析計 nanoLC-ESI-QqTOF (QStar Elite, Applied Biosystems) は網羅的なペプチドの同定用に、nanoLC-MALDI-TOF-TOF (MALDI-TOF/TOF4700, 5800, Applied

Biosystems)はペプチドの高感度検出用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000 Applied Biosystems)は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。

#### (倫理面への配慮)

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関(熊本大学および国立国際医療センター)の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA 遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

### C. 研究結果

#### (1) ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析(上野)

昨年までに、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性を解析したところ、CTL が認識する抗原は病態進行とともに経時的に変化することを明らかとした。本年度は、こうした CTL 抗原の経時的変化が、CTL の抗ウイルス活性に与える影響を解析した。HLA-B35 拘束性で最も頻度が高く認識された Nef 由来の 2 つの合い重なる抗原ペプチドに特異的な CTL クローンを樹立して、その抗ウイルス活性を比較した。その結果、急性期に見られる CTL の方が、慢性期に見られる CTL よりも、抗ウイルス活性に優れていることを見いだした。抗原ペプチドと HLA および T 細胞レセプターの三者の相互作用を解析したところ、この抗ウイルス機能の違いは、抗原ペプチドと HLA が形成する複合体の安定性に依存すると示唆された。

#### (2) 抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用(熊谷)

ヒト細胞上の HIV 抗原の追跡に必要な抗体作製を、T 細胞受容体(TCR)と抗体の機能・構造が類似している点に着目し、TCR の相補性決定領域(CDR)を抗体フレームワークに移植することで、HIV 抗原ペプチド-主要

組織適合性抗原複合体(pHLA)認識能を賦与した TCR グラフト抗体断片の作製を行った。昨年までに創製した TCR グラフト Fv, scFv 断片には、抗原特異性は認められたものの、蛋白質としての構造安定性に難があった。本年度は、抗体断片を IgG 化して、抗原特異性を維持したまま、安定性を向上させることを試みた。その結果、得られた TCR グラフト IgG 抗体は、培養時間の増加に伴い一部分解してしまう傾向がみられたが、動物細胞を用いた一過性発現系によって調製することに成功し、フローサイトメトリーによって結合能も確認した。

#### (3) プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析(荒木)

高感度定量的質量分析で、スタンダードサンプルにおける最も高感度な最適定量解析条件、およびそれに付随する解析プログラムを検討した。nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハイブリッド型質量分析計)および nano-LC-ESI-trapQQQ(四重極型タンデム質量分析計)を用いて、iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM (Multiple Reaction Monitoring)法を確立し、少なくともスタンダードペプチドの定量解析において、1-10 att mol の感度で検出同定可能であることが判明した。生体から分離され、多くの夾雑物が混入しているサンプルにおいても、10 att mol レベルのペプチドはかなりの確率で定量的に解析できることが示唆された。

### D. 考察

(1) HIV 感染急性期と慢性期で、CTL の抗ウイルス応答に機能的な差が生じる原因は、CTL の抗原特異性の経時的な推移と相関していること、CTL の抗ウイルス機能は、抗原特異性によって大きく異なること、CTL の優れた抗ウイルス活性発現には、ターゲットとする抗原ペプチドが HLA クラス I 複合体と安定な複合体を形成し、細胞表面上に長時間にわたって提示されることが重要であることを明らかとした。

(2) TCR グラフト抗体断片を IgG 化するとともに、培養細胞で分泌生産する系の立ち

上げを試みた。その結果、TCR グラフト抗体の機能・特異性を維持したまま、安定性を向上させることに成功した。この方法は他の組換え抗体にも応用可能と考えられた。

(3) 通常、MRM は同位体を内部標準とすることで、タンパク質の絶対定量、相対定量が可能であるが、iTRAQ 法を用いることにより高感度に多検体のサンプル間の相対的な定量が可能であることが明らかとなった。HLA クラス I に、自己由来の多種類のペプチドが載っているコントロール細胞と対象となる HIV 抗原を得意的に結合している細胞から、各々の提示ペプチドを回収し、各々を iTRAQ 標識することによって、目的ペプチドを高感度に定量的に同定できる可能性が高いことが分かった。今後の実際的な測定での検討が期待される。

#### E. 結論

本年度は、それぞれの分担課題について、昨年度までに得た成果をもとに、下記の3点について発展的な成果を得ることができた。

(1) CTL の抗原特異性と CTL の抗ウイルス活性が互いに関連することを明らかとした。(2) TCR グラフティングにより創製した抗体断片を IgG 化することにより、抗原特異性を維持したまま、蛋白質としての安定性を向上させることに成功した。(3) 少なくともスタンダードペプチドの定量解析において、1-10 att mol の感度で検出同定可能である HIV 抗原の高感度定量的同定法の一つを確立した。

#### F. 研究発表

詳細は別紙参照。

研究代表者

上野貴将

1) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., Takiguchi, M., and, Ueno, T. Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 182: 5528-5536, 2009

2) Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to

suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83:7668-7677, 2009

3) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S. Dys-regulated activation of a Src tyroine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol* 221:458-468, 2009

研究分担者

熊谷泉

1. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Takanari Togashi, Nozomi Yokoo, Hiroya Abe, Satoshi Ohara, Tadafumi Adschiri, and Izumi Kumagai, "High-affinity anti-inorganic-material antibody generation by integrating graft and evolution technologies: The potential of antibodies as biointerface molecules", *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
2. Akiko Yokota, Kouhei Tsumoto, Mitsunori Shiroishi, Takeshi Nakanishi, Hidemasa Kondo, and Izumi Kumagai, "CONTRIBUTION OF ASPARAGINE RESIDUES TO THE STABILIZATION OF A PROTEINACEOUS ANTIGEN- ANTIBODY COMPLEX: HyHEL-10- HEL", *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
3. Izumi Kumagai, Ryutarō Asano, Takeshi Nakanishi, Kentarō Hashikami, Sho Tanaka, Adel Badran, Mitsuo Umetsu, "Integration of PEGylation and refolding for renaturation of recombinant proteins from insoluble aggregates produced in bacteria - Application to a single-chain Fv fragment -", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press.
4. Ryutarō Asano, Keiko Ikoma, Hiroko

Kawaguchi, Yuna Ishiyama, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, "Application of the Fc fusion format to generate tag-free bispecific diabodies", FEBS Journal, 277, 477-487 (2010).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

荒木令江

1) An integrated approach of differential Mass Spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival.

Kobayashi D, Kumagai J, Morikawa T, Wilson-M M, Wilson A, Irie A, and Araki N\*

Molecular & Cellular Proteomics,8(10):2350-67, 2009

2) The Contribution of BCR-ABL-independent Activation of ERK1/2 to Acquired Imatinib Resistance in K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells.

Nambu T, Araki N\*, Nakagawa A, Kuniyasu A, Kawaguchi T, Hamada A, Saito H Cancer Science, 2009, in press.

3) Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke associated cholangiocarcinoma.

Wongkham, S., Junking, M., Wongkham, C., Sripa, B., Chur-in, S., Araki, N\* Cancer Science,100(11):2077-84, 2009

4) Silver ion unusually stabilizes the structure of a parallel-motif DNA triplex.

Ihara T, Ishii T, Araki N\*, Wilson A, Jyo A. J. Am. Chem. Soc. 131 (11):3826-3827,2009

5) Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl-alpha-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells.

Motoyama K, Kameyama K, Onodera R, Araki N, Hirayama F, Uekama K, Arima H. European Journal Of Pharmaceutical Sciences 8;38(3):249-61, 2009



## II. 分担研究報告書

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築  
（ヒト T 細胞による HIV 抗原認識の解析）

研究分担者 上野貴将 熊本大学エイズ学研究センター 准教授

研究要旨

昨年までに、日本人 HIV 感染者の検体を用いて、ヒト CTL が応答する HIV 抗原とその階層性を解析したところ、CTL が認識する抗原は病態進行とともに経時的に変化することを明らかとした。本年度は、こうした CTL 抗原の経時的変化が、CTL の抗ウイルス活性に与える影響を解析した。HLA-B35 拘束性で最も頻度が高く認識された Nef 由来の 2 つの合い重なる抗原ペプチドに特異的な CTL クローンを樹立して、その抗ウイルス活性を比較した。その結果、急性期に見られる CTL の方が、慢性期に見られる CTL よりも、抗ウイルス活性に優れていることを見いだした。抗原ペプチドと HLA および T 細胞レセプターの三者の相互作用を解析したところ、この抗ウイルス機能の違いは、抗原ペプチドと HLA が形成する複合体の安定性に依存すると示唆された。抗原ペプチドに内在性の性質が、抗 HIV 機能に優れた CTL 応答に重要であることを示しており、抗原の重要性を改めてクローズアップするものであった。

A. 研究目的

本研究は、3 年計画で HIV の自然感染過程で、ヒト CTL が応答する抗原とその階層性を明らかにすることを目的としている。昨年までに、HLA クラス I 遺伝子型が明らかでない多くの日本人感染者検体を集めるとともに、HLA テトラマーを用いて、CTL 特異性と階層性を解析した。その結果、CTL が応答する抗原が病態進行とともに経時的に変化することを明らかとした。本年度は、そうした CTL 抗原の経時的変化が、CTL の抗ウイルス活性に与える影響を解析した。

B. 研究方法

さまざまな病態にある HIV 感染者から提供していただいた血液検体（国立国際医療センター・岡先生の協力の下）から、末梢単核球（CTL の解析）を調製した。その一部を用いて、HLA クラス I 遺伝子タイピングを行った（HLA 研究所）。また、HIV 抗原に対して特異的な CTL クローンを樹立して、クロミウム放出アッセイを用いて CTL の抗ウイ

ルス活性を評価した。ペプチド・HLA クラス I 複合体（HLA テトラマー）は、大腸菌で生産した組換え蛋白質をリフォールディング後、クロマトグラフィーを組み合わせで精製した。さらに T 細胞レセプター（TCR）遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解析した。

（倫理面への配慮）

HIV 感染者から供与いただいた検体を用いた研究に関しては、関連する機関（熊本大学および国立国際医療センター）の倫理審査会の審議を受け、承認を得ている。また、HLA 遺伝子タイピングについては、ヒト遺伝子解析に関わる研究として、同じく関連機関の倫理審査委員会の審議を受け、承認されている。どちらの場合も、提供者の文書による承諾と個人情報の保護に万全を期すことを含め、承認を受けた研究計画に厳密にしたがって遂行した。

## C. 研究結果

### (1) CTL 応答の抗ウイルス活性

HLA-B35 陽性の HIV 感染者検体を用いて、HIV 特異的な CTL 応答を検索したところ、Nef 由来の互いに合い重なる 2 つの抗原ペプチド {VY8 (VPLRPMTY) と RY11 (RPQVPLRPMTY)} に特異的な CTL 応答が、HIV 感染者で強く誘導されており、VY8 特異的 CTL は急性感染期の感染者で多く見られるが、逆に RY11 特異的 CTL は慢性期に認められた (昨年までの報告)。

多くのコホート研究から、慢性期には CTL の抗ウイルス機能が減弱化しているという報告がなされている。そこで、急性期に見られる VY8 特異的 CTL と、慢性期に見られる RY11 特異的 CTL では、抗ウイルス機能が違うのではないかと考え、まずそれぞれの抗原に特異的な CTL クローンの樹立を試みた。6 人の急性期および慢性期の HIV 感染者の検体を用いた。その中から、それぞれ 3 つずつの CTL クローンを選び、組換えワクシニアウイルスおよび HIV を感染させた CD4 陽性 T 細胞に対する傷害活性を測定した。ターゲット細胞は、HLA-B35 を持つ健常人ボランティアの末梢リンパ球から調製した。その結果、ウイルスの種類に関わらず、VY8 特異的 CTL の方が、RY11 特異的 CTL よりも細胞傷害活性が高いことが明らかとなった (図 1)。

### (2) CTL と HLA テトラマーの相互作用

我々は以前、CTL と HLA テトラマーの相互作用は必ずしも CTL クローン間で一様ではなく、結合時間が短すぎても、長すぎても、CTL の抗ウイルス活性が低下することを報告した (Ueno et al., J Immunol 2002)。そこで、VY8 および RY11 ペプチドを用いて HLA テトラマーを調製して、それぞれの抗原に特異的な CTL クローンと反応させて、両者の相互作用を解析した。その結果、両特異性の間で、HLA テトラマーとの相互作用に顕著な差異は認められなかった (図 2)。このことから、別の要因が、CTL の抗ウイルス活性の違いに影響していると考えられた。

### (3) T 細胞レセプター再構築と抗原ペプチド・HLA 複合体の安定性

T 細胞レセプター (TCR) とペプチド・HLA 複合体との相互作用をさらに詳細に解析するために、TCR 再構築を行った。具体的には、CTL クローンから TCR 遺伝子をクローニングし、TCR 欠損 T 細胞ハイブリドーマ (TG40) に導入した。細胞表面上に TCR を強発現する細胞を選択して、HLA テトラマーを用いて抗原特異性を調べたところ、もとの CTL クローンの特異性を反映していた (図 3A)。また、抗 TCR-CD3 抗体を用いた刺激に対する応答性は同等であったことから (図 3B)、TCR を導入した細胞の機能性が証明された。そこで、次に、抗原ペプチドに対する応答性を評価するため、抗原ペプチド、ターゲット細胞および T 細胞を共存させたアッセイ系を用いて TCR 感受性を調べたところ、両特異性の間で際立った違いは認められなかった (図 3C)。

しかしながら、抗原ペプチドをターゲット細胞にパルスした後、過剰のペプチドを洗い出す別のアッセイ方法を試みたところ、VY8 特異的 TCR の方が RY11 特異的 TCR よりも感受性が高いという結果を得た (図 3D)。このことは、TCR の抗原に対する感受性というよりも、むしろ抗原ペプチドと HLA クラス I 分子との相互作用が CTL 機能に大きく影響することを示唆する。

そこで、実際に、抗原ペプチド・HLA 複合体からペプチドが解離する速さを測定する新しいアッセイ系を構築して解析したところ、VY8 ペプチドの方がより長く HLA と安定な複合体を形成することが分かった (図 2E)。

## D. 考察

我々の研究の結果は、① HIV 感染急性期と慢性期で、CTL の抗ウイルス応答に機能的な差が生じる原因は、CTL の抗原特異性が経時的に推移することと相関していること、② CTL の抗ウイルス機能は、抗原特異性によって大きく異なること、③ CTL の優れた抗ウイルス活性発現には、ターゲットとする抗原ペプチドが HLA クラス I 複合体と安定な複合体を形成し、細胞表面上に長時間にわたって提示されることが重要であることを示している。

また、抗原ペプチドがターゲット細胞上の

HLA 分子から解離する速さが、CTL のターゲット細胞の認識と細胞傷害活性発現に重要であることが分かった。

## E. 結論

抗原ペプチドに対する特異性が CTL の抗ウイルス機能に大きく影響することを明らかにした。さらに、抗原ペプチド・HLA クラス I 複合体の安定性が、その大きな要因であることを明らかとした。これらの発見は、ワクチン抗原のデザインに大きな示唆を与えるものである。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Motozono, C., Yanaka, S., Tsumoto, K., Takiguchi, M., and, Ueno, T. Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 182: 5528-5536, 2009

2) Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. Strong ability of Nef-specific CD4+ cytotoxic T cells to suppress HIV-1 replication in HIV-1-infected CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* 83:7668-7677, 2009

3) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *J Cell Physiol* 221:458-468, 2009

### 2. 学会発表

1) 本園 千尋、滝口 雅文、上野 貴将 : 抗原ペプチド・MHC 複合体の安定性は T 細胞の抗ウイルス機能に影響する、ワークショップ「ウイルス感染に対する獲得免疫」第 39 回日本免疫学会学術集会、大阪国際会議場、2009 年 12 月 2 日 - 4 日

2) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The epitopes dictate the cross reactive capacity of HIV-specific CTLs towards variant antigens, 10<sup>th</sup> kumamoto

AIDS seminar, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

3) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs is dependent on the epitopes, HIV Acute Infection Meeting, September 22-23, 2009, Boston, MA, USA

4) Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Specificity-dependent cross reactive capacity of HIV specific CTLs, 96<sup>th</sup> Annual meeting the American Association of Immunologists, May 8-12, 2009, Seattle, Washington, USA

5) Chihiro Motozono, Saeko Yanaka, Kouhei Tsumoto, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is influenced by intrinsic cooperative thermodynamics of peptide MHC complexes, Keystone Symposia (Prevention of HIV/AIDS), March 22-27, Keystone, Colorado, USA

6) Mwimanzi Philip、上野 貴将、滝口 雅文 : CTL escape Nef variants influence CCR5 down regulation and HIV superinfection susceptibility in primary human macrophages、一般口演「O66 アクセサリー」第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、11 月 26 日 - 28 日

7) Philip Mwimanzi, Hassan Ranya, Shinya Suzu, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effect of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

8) Philip Mwimanzi, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: Susceptibility to HIV superinfection is influenced by CTL-mediated selective pressure on Nef. HIV Acute Infection Meeting, September 22-23, 2009, Boston, MA, USA

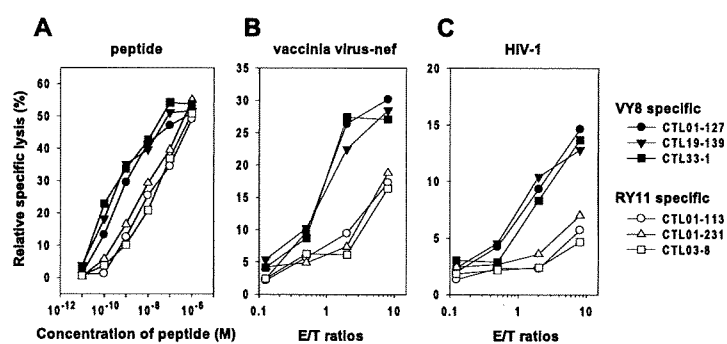
9) Philip Mwimanzi, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages, Keystone Symposia (Prevention of HIV/AIDS), March 22-27, Keystone, Colorado, USA

10) 上野 貴将、本園 千尋、滝口 雅文：CTLの HIV 変異体に対する交差反応性、一般口演 32「ウイルス(9)」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、都市センターホテル、2009 年 10 月 25 日-27 日

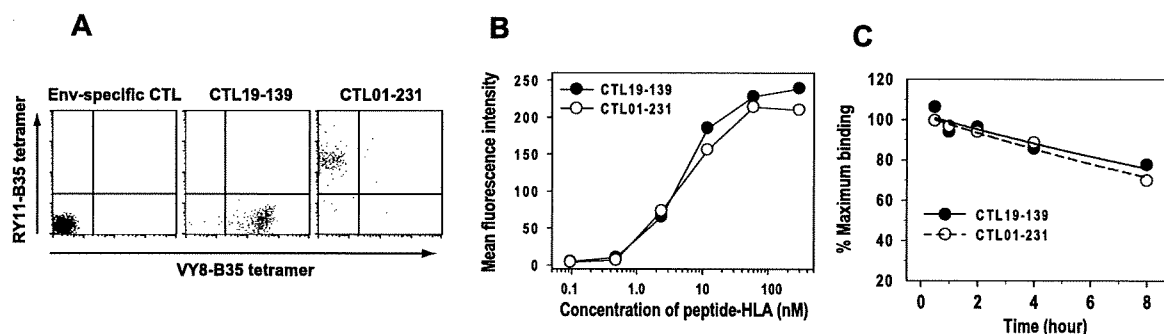
11) Takamasa Ueno: Peptide intrinsic factors that influence CTLs' antiviral activity, 10<sup>th</sup> kumamoto AIDS seminar, September 28-29, 2009, Hotel Nikko Kumamoto, Japan

12) 谷中 冴子、本園 千尋、工藤 基徳、上野 貴将、津本浩平：HLA-HIV 由来抗原ペプチド複合体の熱安定性と抗原性、ワークショップ「HIV と宿主蛋白質との相互作用」第 9 回日本蛋白質科学学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ、2008 年 5 月 20-22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



**Fig 1. Cytotoxic activity of CTL clones.** Primary CD4<sup>+</sup> cells isolated from an HIV-negative donor were pulsed with various concentrations of VY8 or RY11 peptide (panel A), infected with recombinant vaccinia virus expressing Nef<sub>SF2</sub> (panel B) or infected with HIV-1 (panel C) were mixed with the indicated CTL clones. To obtain relative specific lysis values, the cytotoxic activity toward the same target cells but pulsed with no peptide, infected with vaccinia virus alone (*i.e.*; lacking *nef* expression) or infected with HIV-1  $\Delta$ *nef* variant was determined in parallel. Data presented are means of duplicate assays, and an additional set of experiments using another PBMC donor showed similar results.

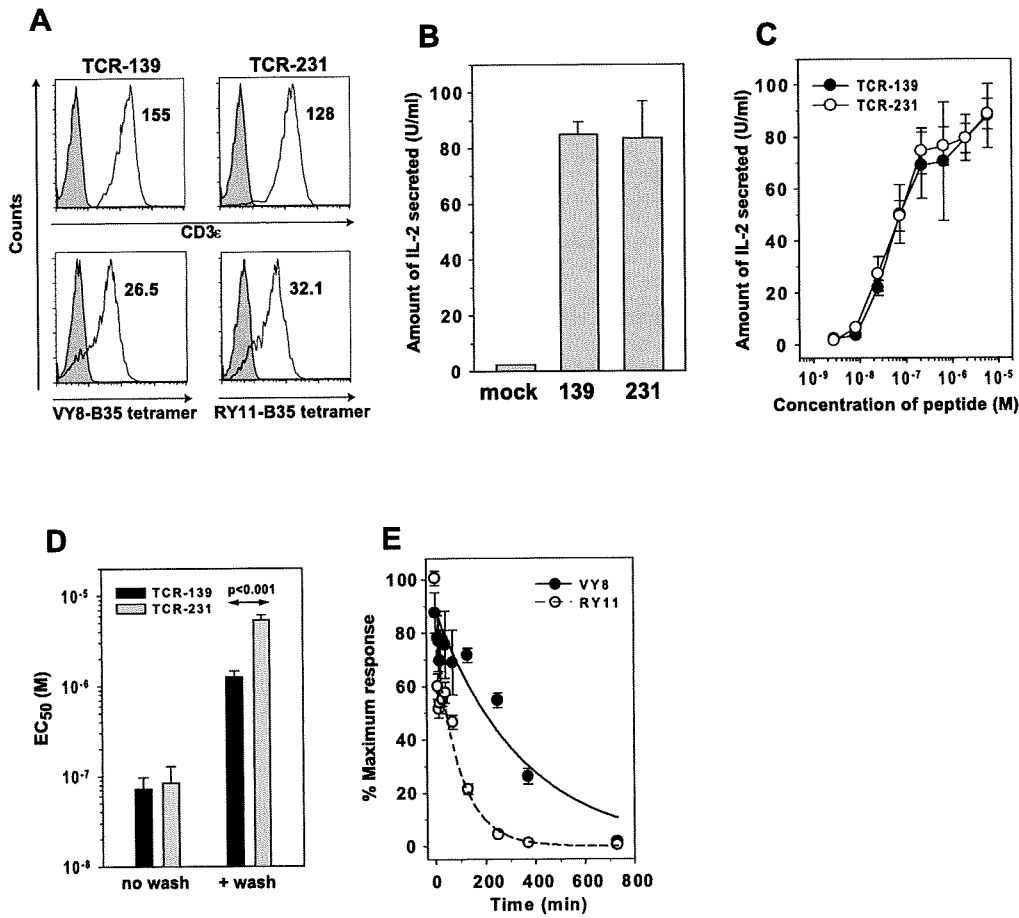


**Fig 2. HLA-tetramer analysis of CTL clones.**

(A) CTL clones specific for an Env peptide, VY8 (CTL 19-139) or RY11 (CTL 01-231) were stained with HLA-B35 tetramers in complex with VY8 or RY11 that had been labeled with PE or allophycocyanin, respectively. In the flow cytometric analysis, a live CD8<sup>+</sup> subset was gated and analyzed for binding with HLA-B35 tetramers.

(B) CTL 19-139 and 01-231 were separately stained with various concentrations of PE-conjugated HLA-B35 tetramers in complex with their cognate peptides and analyzed by flow cytometry. An independent experiment gave similar results.

(C) Kinetic analysis of dissociation of HLA-B35 tetramers from CTL 19-139 and 01-231 that had been stained with their cognate HLA-B35 tetramers. An independent experiment gave similar results.



**Fig 3. TCR-pMHC interactions on TCR-transduced TG40 cells.** (A) TG40 cells alone (shaded areas) or those expressing TCR-139 and -231 (solid lines) were stained with anti-CD3 $\epsilon$  mAb and their cognate HLA-B35 tetramers and then analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity is indicated in each histogram. (B) IL-2 secretion of TG40 cells transduced with mock, TCR-139 or TCR-231 in response to stimulation with CD3 $\epsilon$  mAb. Data are means  $\pm$  SD of quadruplicate assays. (C) IL-2 secretion of TG40 cells transduced with TCR-139 and TCR-231 in response to various concentrations of VY8 and RY11, respectively. TG40 cells, C1R-B3501 cells, and the peptide were co-incubated for the duration of the assay. Amounts of IL-2 obtained for the mock-transduced TG40 cells were always <5.0. Data are means  $\pm$  SD of quadruplicate assays. (D) Functional avidity of TG40-139 and -231 cells were dependent on assay conditions. C1R-B3501 cells, the peptide, and TG40 cells were co-incubated for the duration of the assay (no wash). C1R-B3501 cells and the peptide were incubated, washed, and subsequently mixed with the TG40-139 or 231 cells (+ wash). The EC<sub>50</sub> values (means  $\pm$  SD) were obtained from quadruplicate assays. Statistical analysis was performed by using the two-tailed *t*-test. (E) Kinetic analysis of the peptide dissociation from pMHC. C1R-B3501 cells were pulsed with the VY8 or RY11 peptide (100  $\mu$ M) and washed. A portion of the resultant peptide-loaded cells was taken at each indicated time point and then mixed with TG40-139 or -231 cells for the IL-2 secretion assay. Values presented are means  $\pm$  SD of triplicate assays expressed relative to the maximum response that was arbitrarily set to 100%. The lines shown are based on a single exponential decay.

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築  
（抗体工学を用いた HIV 抗原検出プローブの開発と応用）

分担研究者 熊谷 泉 東北大学大学院工学研究科 教授

**研究要旨** 本研究では、昨年度作製に成功した HIV 抗原ペプチド-主要組織適合性抗原複合体 (pHLA) 認識能を賦与した TCR グラフト抗体断片の構造安定化を図るために、IgG 化させた TCR グラフト IgG 抗体の設計、調製を行った。その結果、得られた TCR グラフト IgG 抗体は、培養時間の増加に伴い一部分解してしまう傾向がみられたが、動物細胞を用いた一過性発現系によって調製することに成功し、フローサイトメトリーによって結合能も確認した。

A. 研究目的

本研究の「ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築」の達成には、ヒト細胞上の HIV 抗原を追跡し、抗原の動態が T 細胞の認識と抗ウイルス機能に与える影響を解析する必要がある。そのためには、HIV 抗原ペプチド-主要組織適合性抗原複合体 (pHLA) へ特異的な抗体分子の開発は、HIV 抗原の追跡とペプチドの提示動態解析に必要であるが、現在国際的な試みにも関わらず、成功例がきわめて限定的である。

そこで本分担研究では、T 細胞受容体 (TCR) と抗体の機能・構造上の類似に着目し、TCR の相補性決定領域 (CDR) に集約される抗原結合能を抗体フレームワークに移植することで、pHLA 認識能を賦与した TCR グラフト抗体の作製に向け取り組み、その可変領域断片 Fv およびその一本鎖抗体 scFv の作製に成功した。本年度は、昨年度作製に成功した抗体断片の安定性を向上させ、かつ、多価効果による機能向上を目指すため、TCR グラフト Fv を持つ IgG 型の完全抗体の作製を行った。

B. 研究方法

**TCR グラフト IgG 重鎖発現ベクターの作製**

昨年度に作製した TCR グラフト scFv 発現用ベクターから PCR により重鎖可変領域断

片を増幅し、当研究室既存の動物細胞用重鎖発現ベクター pcDNA VH-Fc を基に、動物細胞用発現ベクター pcDNA TCR VH-Fc の作製を行った (図 1)。

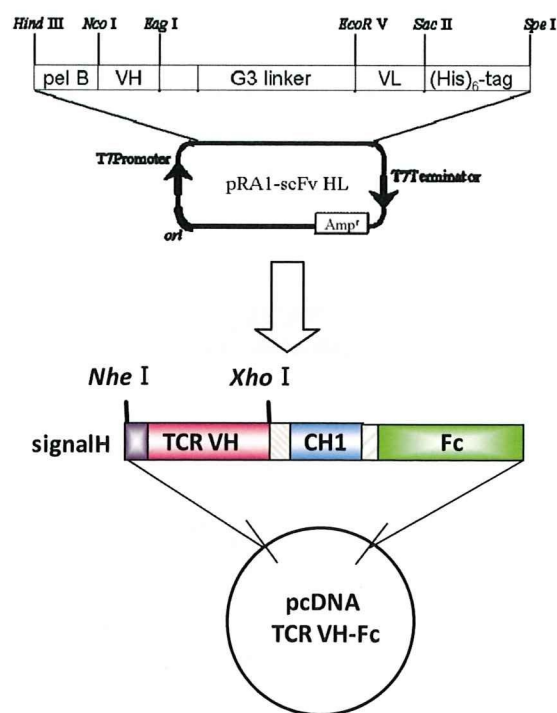


図 1. pcDNA TCR VH-Fc のベクターマップ

1st PCR においては、pRA1-scFv-HL を鋳型として、TCR VH の N 末端側にシグナルペプチド signalH を付加させるように遺伝子増幅を行った。2nd PCR においては、1st PCR に



て増幅した遺伝子断片を鋳型として、5'、3'末端にそれぞれ制限酵素サイト *Nhe* I、*Xho* I を導入した遺伝子断片を増幅した。つづいて、*Nhe* I、*Xho* I を用いた制限酵素消化、Ligation 反応を行うことで動物細胞用発現ベクター pcDNA TCR VH-Fc を構築した。

### TCR グラフト IgG 軽鎖発現ベクターの作製

昨年度に作製した TCR グラフト scFv 発現ベクターから PCR により軽鎖可変領域断片を増幅し、当研究室既存の動物細胞用発現ベクター pcDNA VL-CL を基に、動物細胞用発現ベクター pcDNA TCR VL-CL の作製を行った(図 2)。

1st PCR においては、pRA1-scFv-HL を鋳型として、TCR VL の N 末端側にシグナルペプチド signalL を付加させるように遺伝子増幅を行った。2nd PCR においては、1st PCR にて増幅した遺伝子断片を鋳型として、5'、3'末端にそれぞれ制限酵素サイト *Nhe* I、*Nar* I を導入した遺伝子断片を増幅した。つづいて、*Nhe* I、*Nar* I を用いた制限酵素消化、Ligation 反応を行うことで動物細胞用発現ベクター pcDNA TCR VL-CL を構築した。

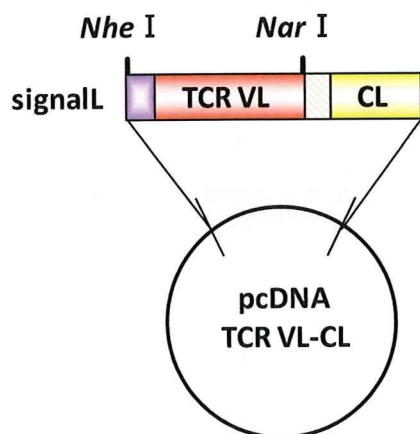


図 2. pcDNA TCR VL-CL のベクターマップ

### 発現系の構築と使用する培地の検討

当研究室において CHO 細胞発現系を用いた大量培養の際に用いている無血清培地である CHO 細胞用 SFM(Serum Free Medium、GIBCO)及び DMEM(SIGMA)を用い、HEK

293 細胞によるタンパク質一過性発現系の構築を行った。通常、動物細胞の培養において、血清が添加剤として用いられるが、結成には抗体成分も含まれるため、動物細胞を用いて抗体を調製する際には、培養の条件検討が必要である。SFM は血清を添加せずに細胞増殖及び維持が可能な培地である。また、DMEM は通常血清を添加して用いる培地であるが、本研究室では、培養上清から抗体を精製する場合には血清を添加せずに使用してある程度の収量が得られることを既に確認している。HEK 293 細胞を用いた発現系は、トランスフェクション試薬添付のプロトコルを参考に、図 3 に示した流れで実験を行った。培養に用いた培地の条件も図中に示した。条件②及び③において血清含有培地での培養時間が出来るだけ長いほうが、細胞が良い状態で保たれるのでと考え、トランスフェクションから 6 時間後まで血清含有培地を用いて培養を行った。

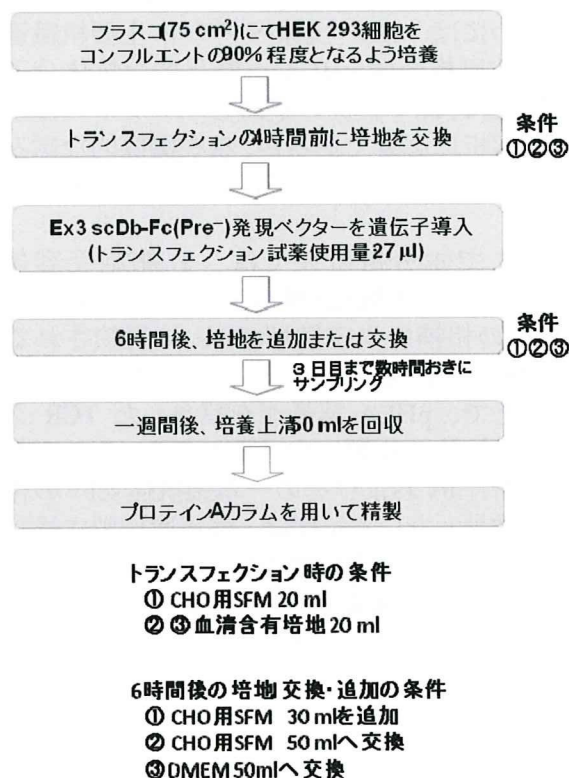
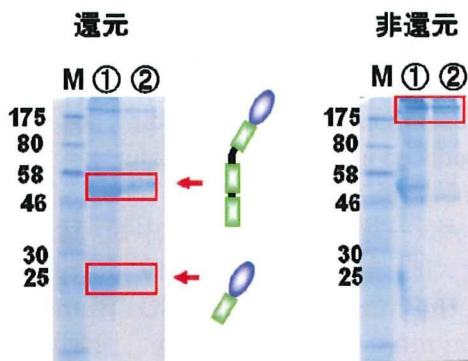


図 3. タンパク質調製の流れ

## C. 研究結果

### TCR グラフト IgG の調製

発現系の条件検討を行い、最適化後に培養、調製した TCR グラフト IgG を、プロテイン A を固定化したカラムに展開させることによって精製・分画した。図 4. に精製後の SDS-PAGE を示す。還元条件での結果をみると、重鎖と軽鎖がほぼ均等に存在している。そして、非還元条件では、両鎖が会合した IgG 構造の形成も確認できていることから、目的の TCR グラフト IgG を調製できたことが確認できる。次に、SFM による培養を 6 日間行った場合をみると、軽鎖の存在割合が低下した。この原因は、長時間培養することによって TCR グラフト IgG の一部が分解してしまうためと考えている。



①: 090808 精製 SFM による培養 3 日間

②: 090820 精製 SFM による培養 6 日間

図 4. プロテイン A 精製後の TCR グラフト IgG の SDS-PAGE 結果

### TCR グラフト IgG の結合活性評価

精製した TCR グラフト IgG の、標的とする HLA-B35 を提示している B3501 細胞への結合活性評価をフローサイトメトリーで行った(図 5)。用いた IgG 発現ベクターがヒト抗体のものであったため検出は、FITC 標識抗ヒト Fc 抗体を用いた。その結果、TCR グラフト IgG は濃度の増加と共に細胞に結合

する量が増加し、その増加は他の IgG コントロール分子よりも大きかった。これより、TCR グラフト IgG は、HLA-B35 に結合活性を有することが示唆された。

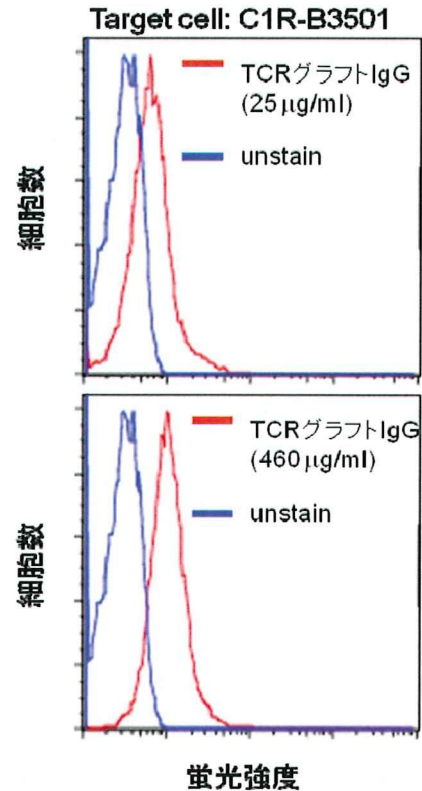


図 5. TCR グラフト IgG のフローサイトメトリーによる結合評価

## D. 考察

昨年度、CDR グラフティングにより TCR グラフト Fv, scFv 断片を作製したが、構造が不安定であり、構造安定化の必要性が示された。今回、IgG 化することによって構造安定化の向上は見られた。しかし、培養時間によって分解が促進されることも示されたため、培養時間の厳密な制御が必要であることが分かった。今後、表面プラズモン共鳴法などを利用してより詳細な結合評価を、多価効果も含めて評価、観察する予定である。

## E. 結論

CDR グラフティングにより作製した TCR グラフト Fv, scFv 断片を IgG 構造に組み込む

ことによって、構造の安定化を向上させることができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Takanari Togashi, Nozomi Yokoo, Hiroya Abe, Satoshi Ohara, Tadafumi Adschiri, and Izumi Kumagai, "High-affinity anti-inorganic-material antibody generation by integrating graft and evolution technologies: The potential of antibodies as biointerface molecules", *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
2. Akiko Yokota, Kouhei Tsumoto, Mitsunori Shiroishi, Takeshi Nakanishi, Hidemasa Kondo, and Izumi Kumagai, "CONTRIBUTION OF ASPARAGINE RESIDUES TO THE STABILIZATION OF A PROTEINACEOUS ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEX: HyHEL-10-HEL", *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
3. Izumi Kumagai, Ryutaro Asano, Takeshi Nakanishi, Kentaro Hashikami, Sho Tanaka, Adel Badran, Mitsuo Umetsu, "Integration of PEGylation and refolding for renaturation of recombinant proteins from insoluble aggregates produced in bacteria - Application to a single-chain Fv fragment -", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press.
4. Ryutaro Asano, Keiko Ikoma, Hiroko Kawaguchi, Yuna Ishiyama, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, "Application of the Fc fusion format to generate tag-free bispecific diabodies", *FEBS Journal*, 277, 477-487 (2010).

##### 2. 学会発表

1. 浅野 竜太郎, 萩原 康世, 熊谷 泉, "市販抗体医薬を凌駕する低分子自己クラスター化抗体の創製", 第9回 日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009
2. 梅津 光央, 小池 博之, 中西 猛, 田中圭介, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, "会合ペプチドユニットによる低分子抗体アセンブリ技術とその応用", 第9回 日本蛋

白質科学会年会, 熊本, 2009

3. 浅野 竜太郎, 生駒 桂子, 石山 優奈, 熊谷 泉, "低分子治療抗体の新規調製法の開発", 第61回 日本生物工学会大会, 名古屋, 2009
4. 熊谷 泉, 鉦 陽介, 浅野 竜太郎, 中西 猛, 梅津 光央, "ピンポイント PEG 化修飾操作を導入した二重特異性抗体巻き戻し技法", 第82回 日本生化学会大会, 神戸, 2009
5. 浅野 竜太郎, 萩原 康世, 熊谷 泉, "低分子自己クラスター化がん治療抗体の創製と精密機能解析", 第82回 日本生化学会大会, 神戸, 2009
6. 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, "Induction of tumor growth inhibition effect of humanized anti-EGFR scFv by multimerization", 第67回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009
7. 石橋 純, 浅野 竜太郎, 梅津 光央, 熊谷 泉, "The design of PEGylated multivalent antibodies for convenient preparation from insoluble aggregates produced in bacteria", 第32回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
8. 小林 一樹, 田原 和浩, 中西 猛, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, "Affinity maturation of the humanized anti-EGFR antibody fragment based on structural information and phage display system", 第32回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
9. 伊藤 晃子, 石山 優奈, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, "Study on functionalization of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy", 第32回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
10. 熊谷 崇, 早坂 文孝, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, "The effect of domain order on function of bispecific diabody", 第32回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特になし

分担研究報告書

ヒト抗原提示システムの包括的解析に基づくエイズワクチン戦略の再構築  
(プロテオミクスによる HIV 抗原の網羅的解析)

分担研究者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨 プロテオミクスの最新の解析技術を駆使することによって、ヒトで提示される HIV 抗原を網羅的、経時的、定量的に解析するシステムを構築している。本年度は、高感度定量的質量分析の融合的解析法を考案し、安定同位体標識法を含む試料調製法、最も高感度な最適定量解析条件と、詳細な定量的解析プロトコルをほぼ確立した。nanoLC-ESI-QqTOF(四重極飛行時間型ハイブリッド型質量分析計)および nano-LC-ESI-trapQQQ(四重極型タンデム質量分析計)を用いて生体試料を用いた安定同位体標識試薬 iTRAQ (isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM (Multiple Reaction Monitoring)法を融合的に併用し、より簡便かつ高感度なプロトコルを確立することによって、多検体から目的ペプチドの定量解析が 1-10 att mol の感度でコンスタントに可能となることが判明した。さらに、生体から分離した 10000 個以上のペプチドその他の夾雑物が混入しているサンプルにおいても、同等レベルのペプチドを定量的に解析できたことから、本法は細胞に提示される HIV 抗原の解析に充分に応用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、ヒト細胞で提示される HIV 由来の T 細胞抗原を蛋白化学的アプローチで包括的に解析し、ヒトの感染防御に関わる基盤情報として蓄積することによって、合理的なワクチン開発を推進することを目指している。本年は昨年を引き続き、最新のプロテオミクスによるアプローチにより、ヒト細胞で提示される HIV 抗原を網羅的・定量的に解析するための高感度定量法を確立し、これをデータベース化することを目的とした実験を試みた。高感度定量解析法として、iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を融合的に用いる方法論の確立を試みた。大量の混合物の中から特定のペプチドの同定を高感度かつ定量的に行うことができる方法論としての MRM 法は、ペプチドのイオンとフラグメントイオンの 2 段階の選別を行うことで、夾雑ピークを軽減することができるため、高感度な検出が可能となる。又、iTRAQ 法は、安定同位体によって異なる分子量をもつ 4-8 種類のペ

プチド標識試薬を用いて、これらを複数（4-8 個）のサンプルの全てのペプチドを個々に標識したのち混合し、LC-MS/MS 解析をもちいることによって、それぞれのサンプル由来のペプチドの定量と同定を同時進行で高感度に行うことができる。現在までに、ヒト細胞で提示される HIV 由来の T 細胞抗原に関して、両方法論を融合的に用いた高感度かつ定量的な解析例や方法論の報告はなく、本研究に最適化したプログラムを構築することが重要かつ有用であると考えられた。本年度は特に、この融合的プロテオミクスの方法論を確立し、生体由来ペプチド解析の感度と分解能、および定量性の最適化を計るとともに、これに応用できるサンプル調整法についても検討を行った。

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、3 台の高感度タンデム質量分析計、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置 (nanoLC), 解析ソフト (AnalystQS, AnalystMRM, MRM pilot, MRM quant, scheduled MRM program, GPS, ProteinPilot, MASCOT 等) を用いた。