

汎 HIV-1 株中和能を有する抗体誘導に関する研究

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

研究要旨 汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫を獲得したヒト HIV 感染者の存在は、液性免疫誘導型エイズワクチンが可能である事を強く示唆している。本研究では日本人血友病 HIV 感染者に見いだされた汎 HIV-1 株中和能を持つ症例を解析の中心に据えて、これらの症例が持つ免疫学的特性をワクチン免疫デザインに生かしてエイズワクチンの実現を目指す。本年度は日本人血友病 HIV 感染者に見いだされた汎 HIV-1 株中和能の解析とワクチンデザインに必須であるエンベロープタンパク質の構造をワクチン標的となるエピトープ間相互作用を通じて理解するための研究を行った。その結果、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫には個体差があり、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫誘導の方法は限定されたものではないことが示唆された。エイズワクチンによる汎 HIV-1 株中和液性免疫誘導には複数の方法が可能であることが示唆された。また、中和エピトープとして知られるレセプター結合部位と V3 ループには定常状態で相互作用があり、中和感受性を相互に規定している可能性が示唆された。これらの研究結果は液性免疫誘導型エイズワクチン開発に大きな示唆を与えると考えられる。

A. 研究目的

HIV感染症のパンデミックは危機的状況にあり、エイズワクチン開発は世界的な要請である。これまでいくつかの臨床試験が行われてきたが、未だ満足できるレベルのワクチン候補はなく、更なる研究開発が求められている。

エイズワクチンには2種類の作用機序が提唱されている。細胞障害性T細胞誘導型、中和抗体誘導型ワクチンの2種類である。自然感染経過の中でウイルス制御に中心的役割を担うのは細胞障害性T細胞である。特に初感染時のviremiaを制御するために重要な役割を担う事が知られている。また、ヒトにおけるHIV自然感染経過において中和抗体は限定的な機能しか検出されなかった事などから、液性免疫誘導型エイズワク

チンは困難であると考えられてきた。しかし、近年になって中和抗体がHIVに対する免疫学的選択圧を常に与えている事が証明された(Richman et al. 2003 PNAS; Wei et al. 2003 Nature; Frost et al. 2005 Nature)。ヒトのHIV感染者で中和抗体誘導型ワクチンが誘導すべき液性免疫を獲得した例が報告されるようになってきた(Li et al. Nat Med 2007; Zhou et al. Nature 2007)。多様なHIV株の複製を阻害できる汎HIV株中和抗体もHIV感染者から続々と分離同定されている(Walker et al. 2009 Science; Simek et al. 2009 JV)。汎HIV株中和抗体を感染者に投与することによるHIV感染症病期進行遅延効果が得られている(Trkola et al. 2005 Nat Med)。汎HIV株中和抗体は動物モデルにおける

攻撃ウイルス接種からの感染阻止もできる (Van Rompav et al. 1998 JID; Gardner et al. 1994 J Med Primatol; Gardner et al. AHR 1995; Shibata et al. 1999 Nat Med; Mascola et al. 2000 Nat Med; Hofmann-Lehman et al. 2001 JVI; others)。これまで樹立に成功しているウイルス感染症に対するワクチンの多くは液性免疫誘導型である (Walker et al. 2008 Science)。HIV 感染を仮に完全に抑制できなくても感染者における病期進行を遅らせる利益があることも中和抗体誘導型ワクチン動物実験で報告されている (Parren et al. 2001 JV; Haigwood et al. 2004 JV)。以上の知見は液性免疫誘導型エイズワクチンが可能である事を示している。

これらの知見に基づき、我々はヒトにおける液性免疫反応の本質を理解することを通じて、中和抗体誘導型エイズワクチンの可能性を追求するための研究を行う。我々は日本人血友病患者で血液製剤にて HIV-1 に感染した症例の中に液性免疫誘導型エイズワクチンが到達目標とする強い液性免疫を持つ感染者を複数同定した。このような患者が持つ抗エンベロップタンパク質抗体レパートリー、抗原の構造的特徴、抗体の遺伝子的特徴を解析し、ワクチン抗原デザインに応用することにより、液性免疫誘導型エイズワクチンの構築を目指す。

一方、液性免疫誘導型エイズワクチンを成功させるためには、抗原の立体構造に対する理解が必須である。エンベロップタンパク質の立体構造は、部分的かつ限定的な条件下で解析されているにすぎない。タンパク質全体の構造を自然な状態で解析した例はなく、現在の物理化学的研究手法ではエンベロップタンパク質の高解像度解析は著しく困難と予想される。エンベロップタンパク質の全体構造が物理的に同定でき

ない事、熱力学動態研究による知見、感染に際して動的な構造変化が予想されている事、免疫学的な圧力によりエンベロップタンパク質に変異が容易に蓄積される事、世界中に蔓延するウイルスのエンベロップタンパク質は非常に多様である事などから、エンベロップタンパク質の構造は非常に動的であると考えられている。一方でエンベロップタンパク質はレセプターに結合してウイルスと細胞の膜融合を惹起する機能を維持する必要がある。さらに、CD4BS, V3 loop, MPER を標的とするヒト由来の汎 HIV-1 株中和能を有するモノクローナル抗体が数種類知られていることなどから、エンベロップタンパク質の構造の可変性には制限があることが、その物理的・可変性の制約メカニズムは十分解明されていない。我々は機能的観点からエンベロップタンパク質の分子構造を明らかにするための研究を並行して行い、研究成果をワクチン開発研究への応用を試みる。

本年度は、日本人血友病 HIV 感染者における汎 HIV 株中和能を有する液性免疫の同定とエンベロップタンパク質の steady-state dynamism の解析を行った。

B. 研究方法

1. 血液製剤によって1980年代にHIVに感染したが、20年にわたる長期間エイズ発症から免れている日本人血友病HIV感染者の血漿をモノグラム法にて解析した。この方法は、HeLa細胞を基盤にして遺伝的改変を行ったTZM-bl細胞にpseudotype HIV-1を感染させて、感染成立により発現するウイルス遺伝子tatがLTR転写によって発現させるルシフェラーゼ活性で感染能を評価するものである。TZM-bl細胞のゲノムにはLTR-luciferaseカセットが安定的に挿入されている。このためHIV感染によってルシフェラーゼ活性が誘

導される。また、HIV-1レセプターのCD4とCCR5が恒常的に強制発現している。偽ウイルスは多様なHIV-1株のエンベロープだけをトランスに供給する複製欠損HIV-1を利用したもので、本法は抗体のHIV-1中和活性を評価する国際的な標準法とされている(Montefiori DC. 2009 Methods Mol Biol)。今回の評価ではルシフェラーゼ活性を半分に減弱させる血漿希釈倍率により中和能力を評価した。使用したウイルスのエンベロープは以下のウイルス由来である：Clade A; Q842.d12, Q168.a2, Q461.e2, Q769.d22; Clade B; SF162, 6535.3, QH0692.42, PVO.4, REJO4541.67; Clade C; Du156.12, CAP210.2.00.E8, ZM197M.PB7, Du172.17。中和感受性の高いTire1ウイルスとしてSF162を使用した。それ以外は中和されにくいTire2ウイルスとして分類されている。なを、本研究は米国Duke大学のMontefiori博士との共同研究である。

2. 多様な変異を持つAD8ウイルス分子クローンに対する中和抗体の感受性を指標としてワクチン抗原としてのエンベロープタンパク質の機能・構造相関を評価した。

2-a. エンベロープタンパク質の機能・構造を評価するプローブとしてV3 loopのGPGRエピトープを認識しクレードBのHIV-1株の約60%を中和するモノクロナール抗体KD-247を利用した。KD-247はマウスで誘導されてヒト化された中和抗体である。ウイルスはAD8を用いた。AD8を用いた理由は、KD-247には耐性だが、447-52Dに感受性があり(Gorny et al. 2004 J Virol)、KD-247中和エピトープはgenotypeで感受性型であるため、polysaccharideやV1/V2 loopによる物理的な抗原抗体接近障害は否定的であるためである。

2-b. ウイルスのエピトープ外変異体はNL4-3

のエンベロープをAD8のエンベロープと入れ替えた変異体分子クローンを使用した。アミノ酸変異はMOLT-4におけるAD8維持によって自然に獲得されたもので、エンベロープの全長にわたって存在し、変異によるエンベロープ機能抑制やウイルス複製への影響はほとんど観察されないことをTZM-bl細胞に対する感染性にて確認した。

2-c. KD-247中和感受性は分子クローンを持つプラスミドを293T細胞に導入して回収したウイルスを使用して、モノグラム法に準じた手法でルシフェラーゼ活性を半分に減弱させる抗体濃度として評価した。野生型のAD8エンベロープを持つNL4-3の感受性を基準にして変異体クローンのKD-247中和感受性を倍数で算定した。

(倫理面への配慮)

ヒトに由来する研究試料を利用した研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査および荻窪病院倫理委員会にて認可を受けている。

C. 研究結果

1. HIV-1非感染者や抗体価の低い症例では検出感度20倍を超える50%中和血漿希釈倍率を与える事例は7.7% (2/26サンプル)の頻度で観察され、陽性と判定された数値も20倍と25倍であった。これはモノグラム法がヒト血漿に含まれる非特異的ウイルス中和能に影響されない事を示している。日本人血友病HIV感染者においてクレードA,B,Cを中和する液性免疫を持つ症例を複数同定した(図1)。各血漿はSF162(図1黒丸)に対して4万倍を超える50%中和血漿希釈倍率を示した。それぞれTire2ウイルスに対する50%中和血漿希釈倍率は、数十から千倍の範囲だった。クレードBに対する中和能は他のクレードよりも

高い傾向にあった。各ウイルスに対する中和プロファイルと50%中和血漿希釈倍率を比較する事により（図1白丸）、長期間エイズ発症から免れている日本人血友病HIV感染者で検出されるHIV株中和能力は汎HIV株中和能として類似しているが、3例の獲得した液性免疫は質的・量的に異なることが示唆された。

2. エンベロープの全長にわたって存在する24個の変異（E31G, T48A, D163G, D163N, V178A, D181G, S186R, N191D, S248N, K285R, N297S, N298Y, R300G, S302G, S370N, N391S, K428E, I488T, Q504R, E506K, I546VZ, A580T, E655G, S760G）を検討した。この中で2倍以上中和感受性を上げるものは9個（D163G, D163N, S186R, S248N, N297S, R300G, S302G, K428E, Q504R；27%）存在した。これらの変異はエンベロープのV1/V2, C2, V3, C4, C5の領域に存在し、V3 loopとエンベロープの各ドメインにsteady-state条件下で構造的・機能的な関係があることがわかった（図2）。これらの変異は相加的に影響するものがあることから、V3 loopはエンベロープの各ドメインから独立に立体構造制御を受けていることがわかった。なかでもC4領域にあるK428E変異はCD4BSエピトープに位置することから、優良な中和エピトープとして知られるCD4BSとV3 loopに定常状態で構造的・機能的な相互関係があることがわかった。またN297S変異はglycosylation siteに対する変異であり、感受性の増加は104.4倍であった。これはglycan shield仮説に良く合致するが、AD8のV3 loopの特性を考えると、アミノ酸変化またはglycosylation欠損による中和エピトープ部位のlocal conformation変化も中和感受性変化の要因と考えられる。

D. 考察

液性免疫を持つHIV感染症制御能力は、

autologousウイルスに対する反応とheterologousウイルスに対する反応の二つに分けて理解する必要がある。これまで液性免疫の反応に関して困難と誤解されてきた一つの要因は、autologousウイルスに対する液性免疫が限定的にしか機能しないことにある。しかし、細胞性免疫誘導型ワクチンの臨床試験の失敗を背景に、ワクチン研究はより基礎的研究に立ち返ろうとする国際的な流れの中にある。我々の研究は日本人で液性免疫誘導型エイズワクチンのモデルになる症例を同定したことを契機として、液性免疫誘導型ワクチンの可能性を追求するための戦略的な基礎的研究として位置づけられる。液性免疫誘導型エイズワクチンのモデルになる症例はこれまで日本人ではほとんど知られていなかった。過去の研究結果を鑑みると、これらの感染者に由来するウイルスのエンベロープタンパク質を単に発現するだけでは液性免疫誘導型エイズワクチンが目標とする汎HIV株中和液性免疫の誘導が達成できる可能性は高いとはいえない。どのような病態やウイルスと免疫の攻防が強い中和抗体を持つ液性免疫を誘導したかを詳細に解析することにより、液性免疫誘導型ワクチンが可能になるかもしれない。少なくとも米国やフランスでも同様の症例が報告されている。これらの患者に共通する中和抗体エピトープの一部はCD4SBと報告されている。これらの研究結果と対比させながら、今後我々の発見した症例における汎HIV株中和能力の本態を明らかにする研究を段階的に進めるべきと考えられる。

近年V3 loopを認識してクレードを超えたウイルス株を中和できる抗体が分離された(Gorny et al, 2002 J Virol; Zolla-Pazner et al, 2004 AHR; Gorny et al, 2006 J Virol)。これは中和エピトープとしてのV3 loopを再評価すべきであることを示唆してい

る。その背景の一つは、V3 loopに対する中和抗体は他の中和エピトープに対する抗体よりも比較的容易に誘導ができるためである(ex. Eda et al, J Virol 2006)。これを新たな抗原構造の理解に基づき注意深く改良すれば汎HIV株中和能力を持つ液性免疫を誘導する事ができるかもしれない。

V3 loopに対する中和抗体の作用機序はエンベロープタンパク質をCD4またはco-receptorに結合させなくすると考えられてきたが、その作用機序の詳細は不明である。我々の研究結果により、V3 loopへの結合を介してCD4SBの構造に影響し、エンベロープとCD4との結合を阻害する可能性が新たに示唆された。

我々は中和抗体の感受性を指標として液性免疫誘導型ワクチン抗原であるエンベロープタンパク質の機能・構造相関を明らかにした。我々の研究アプローチが抗原の理解にとって重要な位置づけにあるのは、既法では極めて困難であった定常状態で native conformation における中和エピトープ間の機能・構造相関を明らかにできたことにある。エンベロープタンパク質の構造は不定形であり、各ドメインが自由な動的特性を持つと考えられてきた。しかし、実際にはタンパク質の機能を保存するためにある程度動的挙動は制約されなければならない。我々の研究結果によりエンベロープタンパク質の各ドメインが定常状態で互いに密な相互作用を持っており、これが立体構造を維持するために重要である事が示された。これはエンベロープタンパク質の立体構造が想像以上に rigid であり、局所の自由な動的振る舞いは極めて限定的である事を示唆している。さらに、仮に一本のポリペプチド鎖にある抗原アミノ酸配列でも、V3 loop の中和エピトープは conformational epitope であり、これまで考えられてきたような linear epitope では

ないことが示唆される。

エンベロープタンパク質の構造が amorphous であると認識されていた背景は多様なウイルス株のエンベロープタンパク質アミノ酸配列を単に比較する研究が多くクローナルな解析が欠如していたこと、X線結晶構造解析において立体構造が解けなかったことが背景にある。我々の解析法は、これまでの問題点を克服して、エンベロープタンパク質の構造に対する理解を深めるために非常に効果的であると思われる。この研究手法を複数の中和抗体と多様なウイルスの遺伝的背景で行う事により、エンベロープタンパク質の機能・構造相関に対する理解を著しく深める事が可能になるとと思われる。本研究アプローチは液性免疫誘導型ワクチンの免疫源をデザインするための重要な情報を提供すると期待される。

E. 結論

日本人で液性免疫誘導型エイズワクチンのモデルになる症例を同定した。汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫には個体差があり、汎 HIV-1 株中和能を持つ液性免疫を誘導するための方法には複数のアプローチがあることが示唆された。中和エピトープとして知られる CD4 レセプター結合部位と V3 ループには定常状態で相互作用があり、中和感受性を相互に規定している可能性が示唆された。これらの研究結果は液性免疫誘導型エイズワクチン開発に大きな示唆を与えると考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Emiko Urano, Hironori Yoshiyama, Norio Shimizu, Jun Komano. A dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression during the acute phase of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* In press.
- 2) Emiko Urano, Reiko Ichikawa, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Jun Komano. T cell-based functional cDNA library screening identified SEC14-like 1a carboxy-terminal domain as a negative regulator of human immunodeficiency virus replication. *Vaccine.* In press.
- 3) Makiko Hamatake, Jun Komano, Emiko Urano, Fumiko Maeda, Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi. Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual. *Euro J Immunol.* In press.
- 4) Ranya Hassan, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, Naoko Takahashi-Makise, Takamasa Ueno, Tsutomu Agatsuma, Hirofumi Akari, Jun Komano, Yutaka Takebe, Kazuo Motoyoshi and Seiji Okada. Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. *Journal of Cellular Physiology.* 2009 Nov;221(2):458-468.
- 5) Tsutomu Murakami, Sei Kumakura, Toru Yamazaki, Reiko Tanaka, Makiko Hamatake, Kazu Okuma, Wei Huang, Jonathan Toma, Jun Komano, Mikiro Yanaka, Yuetsu Tanaka, and Naoki Yamamoto. The Novel CXCR4 Antagonist, KRH-3955 Is an Orally Bioavailable and Extremely Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Comparative Studies with AMD3100. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy.* 2009 Jul;53(7):2940-2948.

学会発表

(国際学会)

- 1) Tsutomu Murakami, Kei Miyakawa, Cecilia Bucci, Jun Komano, Naoki Yamamoto. Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009
- 2) Emiko Urano, Hiroyuki Okunaga, Yuko Morikawa, Jun Komano. Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA 2009

(国内学会)

- 1) 駒野 淳. オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクトシンポジウム「これからのHIV研究の進むべき方向」第23回日本エイズ学会, 名古屋, 11月27日 2009
- 2) 濱武牧子, 宮内浩典, 青木 徹, 浦野恵美子, 駒野 淳. Higher-order homotypic oligomerization determines the steady-state cell surface levels of CXCR4. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 3) 上原大輔, 坂本真衣子, 吉川治孝, 泉川圭一, 早川俊哉, 駒野 淳, 高橋信弘. Proteomic search for the function of HIV-1 Rev protein in human cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 4) 青木 徹, 清水佐紀, 浦野恵美子, 濱武牧子, 寺嶋一夫, 玉村啓和, 村上 努, 山本直樹, 駒野 淳. Development of 5th generation lentiviral vector. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009
- 5) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009

6) 村上 努, 呉 鴻規, 富田香織, 伯川冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本直樹. Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割 (Rab7を中心に). 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

7) 浦野 恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳, 森川 裕子. 酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009

8) 浦野 恵美子, 市川 玲子, 森川 裕子, 芳田剛, 小柳 義夫, 駒野 淳. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

9) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田 史子, 長塚靖子, 竹腰 正隆. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離: HIV-1に対するnatural humoral resistance. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

10) 滝澤 万里, 草川 茂, 北村克彦, 長縄 聡, 村上 利夫, 本多 三男, 山本 直樹, 駒野 淳. Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

11) 村上 努, 呉 鴻規, 富田 香織, 伯川 冬美, 駒野 淳, 千葉 丈, 山本 直樹. HIV-1粒子形成におけるRab7とそのエフェクタータンパク質の役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009

2. 実用新案登録
なし
3. その他

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

Hideto Chono, Jun Komano, et al. Inventory of high-titer lentivirus production system by modifying the amino-terminus of Gag (出願2009年11月19日 特願2009-263587).

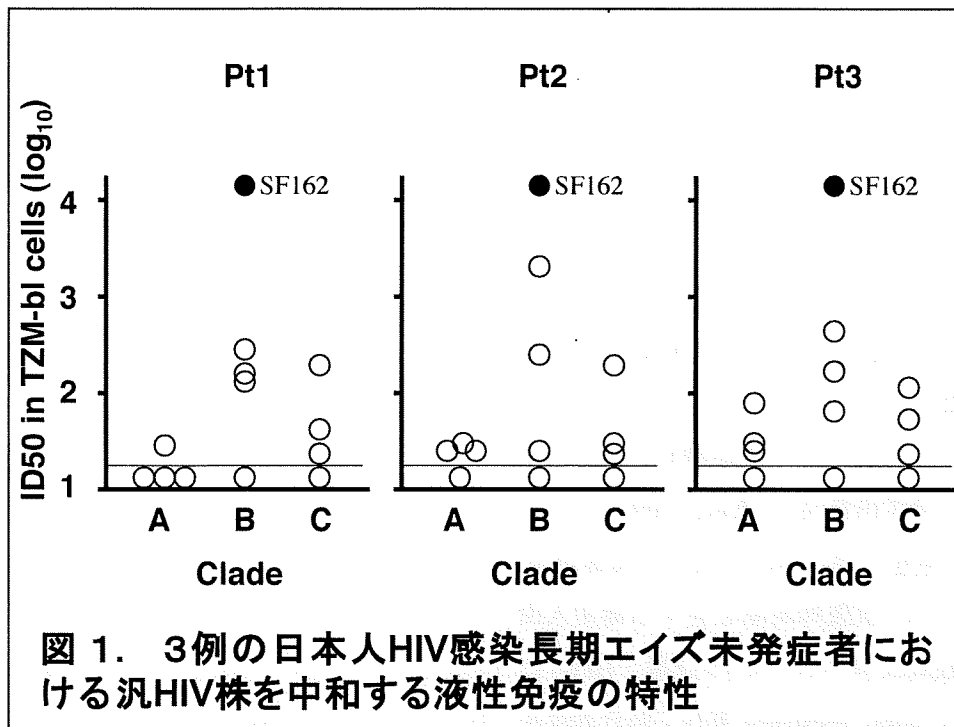


図 1. 3例の日本人HIV感染長期エイズ未発症者における汎HIV株を中和する液性免疫の特性

Mutations affecting viral neutralization by KD-247			
< 2-fold	> 2-fold	Env location	Fold sensitization
E31G [§]	D163G	V1/V2	52.2
T48A [§]	D163N	V1/V2	65.3
V178A [§]	S186R	V1/V2	5.6
D181G	R248N	C2	6.1
N191D [§]	N297S	V3	104.4
K285R	R300G	V3	4.6
N298Y	S302G	V3	47.5
S370N	K428E	C4	8.0
N391S	Q504R	C5	2.6
I488T			
E506K			
I546V			
A580T [§]			
E655G			
S760G			

§: Estimated from the fold sensitization of a mutant carrying multiple mutations.

図 2. KD-247 中和感受性を変化させない変異と変化させるnon-epitope変異、変異場所、変化の大きさ

研究要旨 分担研究者は、HIV-1 の粘膜組織を介した伝播の阻止及び腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphatic tissue: GALT)におけるウイルスの増殖を抑えることを視野に入れた粘膜免疫を誘導するワクチンの開発のための基礎研究を行っている。本年度は、SIVmac239 外被糖タンパク質 (gp140)、サル CCR5 の UPA に対する自己抗体を誘導する抗原 Rh-cDDR5、M 細胞標的分子 TGDK、及びアジュバンドとして CpG-ODN を結合した Senju vaccine を接種したアカゲザルで誘導された抗体の *in vitro* におけるウイルス感染防止効果を検討した。その結果、誘導された抗体により、SIVmac239 の感染が阻害された。また興味深いことに HIV-1 の R5 株 (JR-FL) および X4 株 (LAV) の感染を防止することが示された。これは SIV および HIV-1 の外皮糖タンパク質に共通の構造を認識する抗体によるものと考えられた。以上の結果から Senju vaccine はウイルスの感染防止する抗体を誘導できる優れた免疫原性を有していることが示唆された。我々が開発を進めているワクチンによるウイルス感染防止効果を正しく評価するためには、サルにおける SIV の経膣感染モデルの構築が必要になる。本年度は、その端緒としてサル膣・子宮の形態学的解析を行った。その結果、内子宮口組織における特徴的な形態が観察され、これがウイルス感染に重要になると考えられた。

A. 研究目的

現行の抗 HIV 療法 (HAART) により、エイズ発症を制御することが可能になったが、ウイルスを完全に排除することができない。HAART を生涯にわたり継続しなければならないことは、患者の心身への大きな負担となるばかりでなく、経済的負担も大きい。このことから、HIV-1 感染後のウイルスの制御のみならず、ワクチンにより HIV-1 感染拡大を防ぐことは、厚生労働行政の観点からも重要になる。

そのような背景から研究分担者は、HIV-1 の伝播阻止と、腸管関連リンパ組織 (GALT) における爆発的なウイルスの増殖を抑えることを視野に入れた粘膜および全身性免疫を誘導する HIV-1 ワクチンの開発を目指している。その際、研究分担者は 1) 初発感染部位である粘膜に特化した粘膜免疫系の賦活、2) 免疫系の破綻の防止、3) 免疫攻撃からの逃避するウイルスへの対応、4) 個体へのスピーディなウイルス感染への対応、の 4 項目を達成することが重要になると考えた。それぞれの課題を達成するために、

1) M 細胞標的分子 TGDK によるワクチン抗原の効率的な GALT への送達、2) Rh-cDDR5 によって誘導される CCR5 の第 2 細胞外ループの前半領域である undcapeptidyl arch (UPA) を認識する抗体による CCR5+CD4 リンパ球のウイルスからの保護 3) native な立体構造を保持した 3 量体 gp140 および変性 gp140 による多種多様な抗体の誘導、および 4) 交叉免疫の誘導を利用した抗体価の維持、を手段とすることを考えている。

本年度は、研究分担者が開発している Senju vaccine (Fig. 1) をアカゲザルへ皮下および経口投与し誘導された抗体の *in vitro* におけるウイルス感染防止効果の検討を行った。

また、本ワクチン接種サルにおけるウイルス感染防止効果を正しく評価するために不可欠となる、安定な SIV の膣・子宮粘膜感染モデルの確立を目指している。そこでサル膣・子宮組織の形態学的な特徴を理解するため、その詳細な観察を行った。

B. 研究方法

Senju vaccine の調製

コア抗原（高分子 PEG）に TGDK、Rh-cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140 をコンジュゲートさせた (Fig. 1)。経口投与させるために、すべてをコンジュゲート後、溶液中に賦形剤として乳糖を加え凍結乾燥し得られた粉末を腸溶性カプセルに封入した。

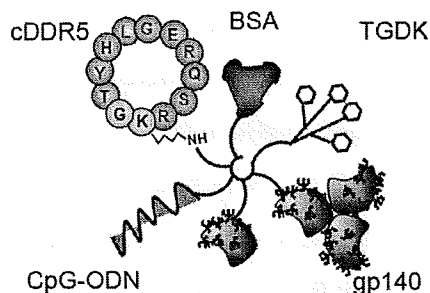


Fig. 1 Senju vaccineのモデル

Senju vaccine のアカゲザルへの皮下免疫・経口免疫及び採取したサンプルの調製

Senju vaccine の皮下免疫は雌アカゲザルの鼠径部への皮下注射にて行った。対照群として PEG3,500 Da を使用した。0、1、および 6 weeks の 3 回にわたり投与した。

経口投与は、調製した経口用 Senju vaccine と対照群として BSA、PBS (-)由来の塩を含有した 3,500kDa の PEG をそれぞれメスのアカゲザル五頭ずつに Fig. 2 に示すスケジュールで経口投与した。初回免疫前から血清、糞便を回収し、血清は血液を採取後分離し、糞便は約 3 g をアセトンパウダー化しそれぞれ-80°Cで保存した。

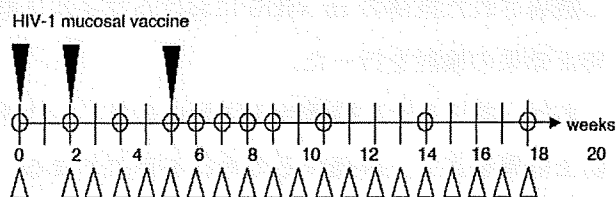


Fig. 2 Immunization schedule. Serum and stool were collected according to the immunization schedule. Serum marked with open circle and stool marked with open triangle have been collected.

ELISA

アカゲザルから回収したサンプルの Rh-cDDR5 及び gp140 に対する抗体の解析は ELISA を用いて行った。ELISA には、一次抗体として採取した血清および糞便抽出液を用いた。

in vitro におけるウイルス感染阻害効果の検討

DEAE dextran を含む SIVmac239 または HIV-1 (JR-FL 株、LAV 株)を、分子量 100,000 cut の透析膜で透析したアカゲザルの血清または糞便抽出液を前処理し、カニクイザル由来 HSC-F 細胞またはインジケーター細胞である MAGIC-5 細胞に接種した。なお、抗 Rh-cDDR5 抗体のみの効果を検討するために gp140 抗原を、一方抗 gp140 抗体のみの効果を検討する場合は Rh-cDDR5 を前処理した。感染阻害の評価は proviral DNA 量を qPCR assay で行う方法と、MAGIC-5 細胞を X-gal で染色してカウントする方法で行った。

サル膺-子宮組織の形態学的観察

メス、4~5 才カニクイサル膺-子宮組織の HE 染色サンプルを常法に従い調製した。

(倫理面への配慮) 動物実験は熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行う。

C. 研究結果

皮下投与アカゲザルの血清中の抗 gp140 抗体価の測定

鼠径部へ Senju vaccine を皮下免疫した雌アカゲザルの血清中に誘導された抗 gp140 抗体価の測定を ELISA で行った (Fig. 3)。その結果、免疫後 4 weeks で抗体価の上昇が観察されはじめ、7 weeks でピークに達した。12 weeks 辺りから抗体価の漸減が認められるようになり、およそ 60 weeks でバックグラウンド程度にまで抗体価の低下が観察された。

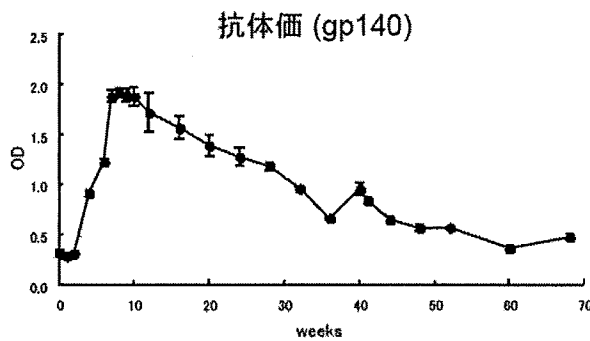


Fig. 3 Senju vaccine 皮下免疫後の血清中抗gp140抗体の誘導

In vitroにおける血清中の抗 gp140 抗体によるウイルス感染阻害効果の検討

Senju vaccine を皮下投与した雌アカゲザルの 0、12、及び 23 weeks の血清中に含まれる gp140 抗体によるウイルス感染阻害効果を検討した。

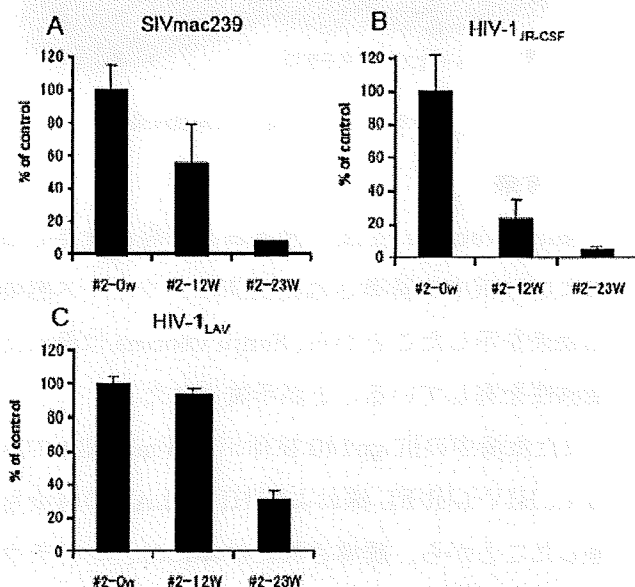


Fig. 4 Senju vaccineを皮下投与したアカゲザルにおける血清中 抗gp140抗体の感染防止効果.

SIVmac239 に対して、12 weeks および 23 weeks 血清により有意な感染防止効果が観察され、抗体価がピーク時に近い 12 weeks サンプルより、抗体価が漸減し始めている 23 weeks のサンプル中の gp140 抗体がより効果的に感染を阻害した (Fig. 4A)。また、セカンドレセプターとして CCR5 および CXCR をそれぞれ利用する HIV-1_{JR-FL} 株および HIV-1_{LAV} 株に対する、0、12、及び 23 weeks の血清中に含まれる gp140 抗体の感染阻害効果を

MAGIC-5 assay で行った。その結果、興味深いことに、12、及び 23 weeks のサンプルで感染阻害効果が観察され、23 weeks サンプルにおいて顕著であった (Fig. 4B, C)。

経口投与アカゲザルの糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA の抗体価の測定

調製した Senju vaccine とコントロールとして BSA、PBS (-)由来の塩を含有した 3,500kDa の PEG をそれぞれメスのアカゲザル五頭ずつに Fig. 2 に示すスケジュールで経口投与した。初回免疫前から糞便を回収しサンプリングした。採取した糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA 抗体を ELISA によって解析をおこなった。その結果、免疫群において Repeated Measures ANOVA 検定で有意差があり、Dunnett's-test の結果免疫群において 0 週と初回免疫後 14 週間に有意差が認められた (Fig. 5A)。一方、コントロール群では有意差は認められなかった (Fig. 5B)。

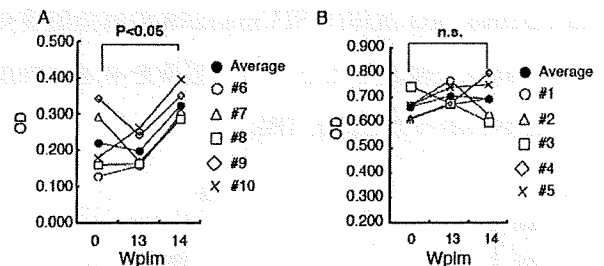


Fig. 5 Senju vaccineを経口投与したアカゲザルにおける糞便中 anti-Rh-cDDR5 抗体 (IgA) の誘導. A:senju vaccine群、B:対照群

In vitroにおける経口投与アカゲザル糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA による SIVmac239 の感染阻害効果の検討

糞便中に確認された抗 Rh-cDDR5 IgA 抗体の SIVmac239 に対する感染阻害効果を *in vitro* で検討した。抗体価の上昇が確認された初回免疫後 14 weeks の糞便とコントロールとして 0 weeks の糞便を用いて検討した。その結果免疫群である #6, #7, #8, #10 のアカゲザルにおいて有意に SIVmac239 の感染が抑制された (Fig. 6)。

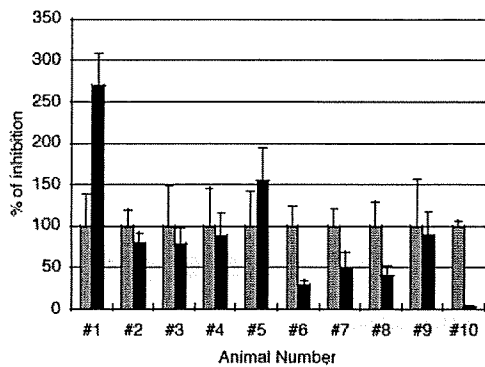


Fig. 6 Senju vaccineを経口投与したアカゲザルにおける糞便中 anti-Rh-cDDR5 抗体によるSIVmac239感染防止効果。
#1-#5対照群；#6-#10ワクチン群；
灰色 0週、黒 14週

経口投与アカゲザルの血清中の抗 Rh-cDDR5 IgG の抗体価の測定と感染阻害効果の検討

糞便中の抗 Rh-cDDR5 IgA 抗体の抗体価が最も上昇し、感染阻害効果も強かった#10 のアカゲザルについて、血清中の抗 Rh-cDDR5 IgG 抗体について解析した。ELISA によって抗体価を測定したところ初回免疫後 20 weeks で抗体価の上昇が認められ(Fig. 7A)、さらに初回免疫後 20 weeks の血清中の抗 Rh-cDDR5 IgG 抗体の SIVmac239 の感染阻害効果を *in vitro* で検討したところ、感染を有意に抑制することがわかった (Fig. 7B)。

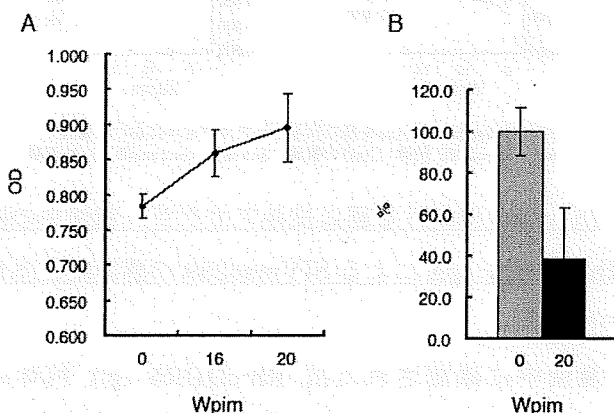


Fig. 7 Senju vaccineを経口投与したアカゲザル#10における血清中 anti-Rh-cDDR5 抗体の誘導とSIVmac239感染防止効果。
A: 抗体誘導の推移、B: 感染防止効果 灰色 0週、黒 20週

カニクイサル膣・子宮組織の形態学的観察

カニクイサル膣・子宮組織の HE 染色切片を Fig. 8 に示した。特に、膣、外子宮口および内子宮口の上皮

組織の詳細な観察を行った。膣から外子宮口は、扁平上皮組織であり、その上層は何十にもなるケラチンの多層構造からなる角化組織であった。一方、内子宮口付近では単層円柱上皮組織であった。外子宮口と内子宮口の間部位付近に、多層構造の角化組織からなる扁平上皮組織と角化組織が存在しない単層円柱上皮の融合部位を観察した。また興味深いことに、円柱上皮組織からなる内子宮口組織がヘルニア様に外子宮口付近へ露出している (内子宮口ヘルニア)様子が観察された。

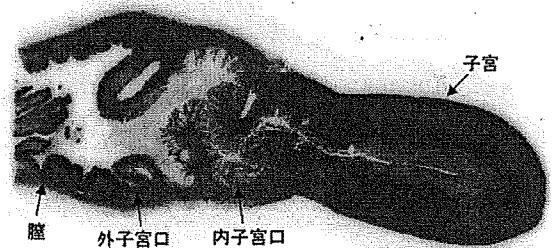


Fig. 8 カニクイサル膣-子宮組織HE染色

D. 考察

Senju vaccine を皮下投与および経口投与し血清および粘液中に誘導された抗体は、ウイルス感染防止効果を示したことから、Senju vaccine は優れた免疫原性を有していることが示唆された。

また血清中の抗 gp140 抗体が SIVmac239 のみならず、HIV-1JR-FL 株および HIV-1LAV の感染も阻害したことから、誘導された抗体には、レンチウイルスの外皮糖タンパク質に共通の構造を認識する抗体が含まれていると考えられた。例えば糖鎖構造を認識する抗体による感染防止の可能性が考えられた。

サルにおける膣・子宮粘膜感染を達成するため、カニクイザルの膣・子宮組織切片の詳細な形態学的観察を行った。膣-外子宮口においては、物理的な障壁となる多重のケラチン層からなることから、SIV 感染のためには出血を伴う裂傷あるいは出血を伴わない分子裂傷が必要不可欠であると考えられる。一方、内子宮口(子宮頸部)では単層円柱上皮組織からなることから、裂傷を伴わない SIV の感染は SIV この領

域で起こることが考えられる。また、内子宮口組織の外子宮口付近への露出(内子宮口ヘルニア)が観察されたことから、この現象はウイルス感染に極めて重要であると考えられる。安定的な膣-子宮粘膜感染を達成するためには、ホルモンによって内子宮口の性的な活動を高めることが肝要であると考えられる。

E. 結論

Senju vaccine のアカゲザルへの免疫によって誘導される抗体には、ウイルス感染防止効果を示すことが明らかになり、優れた免疫原性を有していることが示唆された。

サル膣-子宮組織の形態学的な詳細な観察により、内子宮口組織がウイルス感染に重要な領域であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Misumi, S., Shoji, S et al. Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer *J. Immunol.* 182. 6061-70. 2009.

2. 学会発表

1. 松浦薫、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三
Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK)を用いた新規M細胞標的粘膜ワクチン戦略 第82回日本生化学会大会 プログラム p396

2. 甲斐光、三隅将吾、松本浩和、松浦薫、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三
Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK)のM細胞標的能の検討とワクチンへの応用. 第57回日本ウイルス学会学術集会 プログラム抄録集 p218

3. 三隅将吾、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三
霊長類M細胞標的分子を用いたHIV経口ワクチンの開発. 第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 講演要旨集 p37

4. 野崎清輝、三隅将吾、松本浩和、甲斐光、松浦薫、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三. M細胞標的分子 Tetragalloyl Lysine dendrimer (TGDK)を用いたHIV粘膜ワクチン開発. 第23回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集. P493

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

HIV の感染防止、AIDS 発症防止に関する免疫学的基礎研究

分担研究者 玉村 啓和 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所教授

研究要旨 我々は、これまでワクチン創製研究であまり取りあげられなかった以下の4種をターゲットとして設定し、有機合成化学を巧みに用い人工抗原分子を作製し、また、新規阻害剤を2種創製し、その評価を行っている。1) HIVが標的細胞へ侵入するときのHIV表面蛋白gp41の立体構造変化をターゲットとして設定し、gp41のC端側ヘリカル領域の断片ペプチドに親水性領域を付与した形で化学合成し、膜融合の中間体構造である3量体を形成するようにアッセンブリーし抗原分子を作製した。前年度gp41-N363量体構造を模倣した抗原分子を合成し、中和抗体の誘導に成功した。また、gp41-C343量体抗原分子の合成にも成功し、テンプレート上に配置させた効果が見られた。C34単量体抗原分子では十分な抗体誘導能が示された。現在、C343量体抗原分子のマウスでの免疫を行っている。2) HIV表面蛋白gp120のCD4 binding/コレセプターbinding領域をターゲットとし、効率的にエピトープを提示できるように構造固定化した環状ペプチドミメティックを作製した。ファージディスプレイライブラリーからの*in vitro*アフィニティー選択による特異的抗体を創出し、現在モノクローナル抗体の創製を検討中である。3) 標的細胞側のコレセプターCXCR4のN端領域および3種の細胞外ループに親水性領域を付与したペプチドを合成し、人工テンプレート上に構築した分子を作製した。マウスに免疫し、抗体誘導を行った。MAPテンプレートで4価型にしたNt-2が抗体誘導能を示した。4) 侵入時に結合する宿主側のCD4の小分子mimicの構造活性相関研究を行った。また、HIV侵入の動的超分子機構においてgp120構造変化を誘起することや、抗V3抗体の中和活性を増強する効果があることを見出した。また、CD4mimicとCXCR4アンタゴニストT140とのhybridの合成に成功した。5) Vpr断片からIN阻害活性を有するペプチドを見出し、活性に必要なアミノ酸を同定した。6) Matrix断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドより抗HIV活性を有する配列を見出した。

A. 研究目的

今までにエイズに関してもワクチン創製の研究がかなり精力的に行われてきたが、根本的な治療法の確立には至っていない。我々はワクチン作製に対して、従来の概念とは全く異なる方向から図1に挙げた4種類のアプローチすることにした。1)あまり研究されていなかった標的細胞へのHIVの侵入時の立体構造変化に関わる蛋白gp41を認識する抗体を作製することに

した。従来は、HIV表面蛋白gp120上の表面に露出した領域を抗原としていることが多かった。しかし、ここ数年のHIVの標的細胞への侵入機構、種々の蛋白質が複雑に相互作用する動的超分子機構とよばれるメカニズムが明らかになってきたことにより、立体構造変化を起こす蛋白をターゲットとし、構造変化の中間体を有機化学的に再構成した人工分子を抗原とすることにした。具体的にはgp41の3量体ヘリ

カル構造である。2) 今まで多大な数のワクチンを作製したが、成功しなかった原因のひとつとして、gp120 のある領域の部分ペプチドを抗原として用いていた(中和抗体のエピトープはβ-ヘアピンループ構造を取っていることが多い)ために、この部分ペプチドがもとの gp120 上での本来の立体構造を再現できていなかった(もとのヘアピン構造を保持できなかった)ということが考えられる。そこで本研究では、いままでも鎖状ペプチドをベースに抗原として用い、鎖状を環状にし、立体構造を固定化したペプチドミメティックを合成した。具体的には、長期未発症の HIV 感染者の間で、CD4 binding/ コレセプター-binding 領域が中和抗体のエピトープとして高く保存されている断片ペプチドを取りあげた。また、この領域はβ-ヘアピンループ構造にあたる領域であり、これまで鎖状のペプチドでは効率的に抗体が誘導できなかったため、β-ヘアピンループ構造を提示できるように環状構造に固定化したペプチドミメティックを合成した。

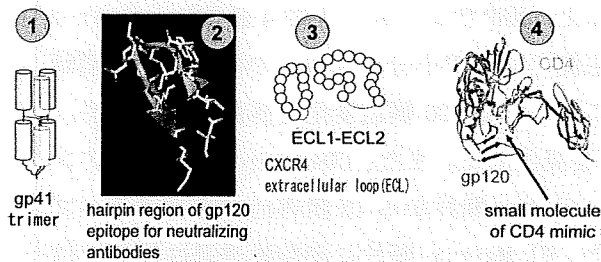


図1 4種のアプローチによるエイズワクチン作製

3) 一般のワクチンの常識では、抗原分子のターゲットとしてウイルス外皮蛋白等を基盤とするのが一般のワクチンの常識であるが、我々のワクチン創製のターゲットとしては常識にこだわらなかった。すなわち、標的細胞側のコレセプター(第二受容体)にターゲットを設定した。この利点として、レトロウイルスは非常に変異しやすいので、ワクチンによって誘導さ

れる抗体は変異してしまったウイルスを効率よく認識することができなくなるが、標的細胞側(宿主ヒト側)を抗原としてワクチンを作製した場合、ホスト蛋白質は変異しないと考えられるので、ワクチンが徐々に効かなくなることがない。しかし、レセプターの生理的な作用をブロックすることによる副作用の可能性に十分注意しなければいけない。実際、具体例としてコレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ(Ecl1-Ecl3 & N端)を取りあげ、環化&構造固定化したペプチドミメティックを合成し、効率的な抗体誘導をはかることにした。4) HIV-1 の gp120 が宿主細胞の CD4 と、ケモカインレセプター-CCR5 もしくは CXCR4 のいずれかへ結合することにより、HIV は宿主細胞へ侵入する。そこで、CD4 の小分子 mimic 誘導体を合成し、HIV 侵入の動的超分子機構への影響や中和抗体等との併用の効果を検討した。また、CD4 mimic と CXCR4 アンタゴニスト T140 との hybrid を合成した。5) HIV に感染すると数年の無症候状態を経て、体内で徐々にウイルス数が増え、ゆっくり免疫不全を引き起こすので、宿主に寄生している期間が非常に長い。すなわち、HIV 自身の生命システムに、急激なウイルス数の増加を抑制するようなフィードバックシステムが備わっていると考えられる。本来ウイルスを構成する蛋白質にこのような自身の複製を抑制する機能をもった部分ペプチドが内在しているとも考えられる。すなわち、HIV 構成蛋白質全体ではもちろん抗 HIV 活性を持たないが、それに含まれる部分ペプチド断片に抗 HIV 活性がある可能性がある。そこで、Vpr 断片から IN 阻害活性を有するペプチドを見出し、活性に必要なアミノ酸を同定する。6) さらに、生体構成蛋白である細胞外マトリックスであるラミニンやフィブリンなどの高分子の蛋白質でも部分ペプチドに親分子とは違う活性があるものが報告されている(Kasai S, et al.

Biochemistry, 46(13), 3966-3974, 2007)。そこで、Matrix 断片に細胞膜透過性配列を付加したペプチドより抗HIV活性を有する配列を探索する。以上これら6種のアプローチによりワクチン創製および抗HIV剤の創製を目標とした。

B. 研究方法

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N およびC 端側)3 量体の合成と抗体誘導

N 端側 N36 の3 量体は前年度までに合成を終了している。今年度は gp41 のC 端側に存在するヘリカル領域のペプチド C34 を3 量体にアッセムリーするための人工テンプレートを作成した(図 2)。また、別に C34 に親水性領域を付加したペプチドを Fmoc 型固相合成法により合成した(図 3)。Native Chemical Ligation 法を用いて3 個の C34 誘導体を図 2 で合成した C3 対称性テンプレート上に配置し、三量体とし抗原分子とする(図 4)。そして、合成した抗原分子を用いてマウスにて抗体誘導を検討する。その血清の抗 HIV 活性を評価する。

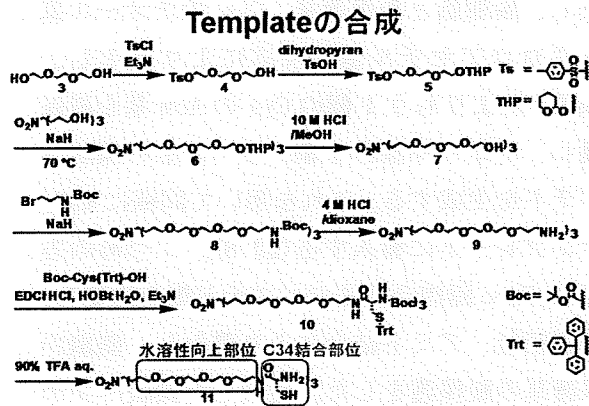


図 2 位相が完全に等価な C34 3 量体アッセムリーのためのテンプレートの合成スキーム

C34ペプチド誘導体の合成

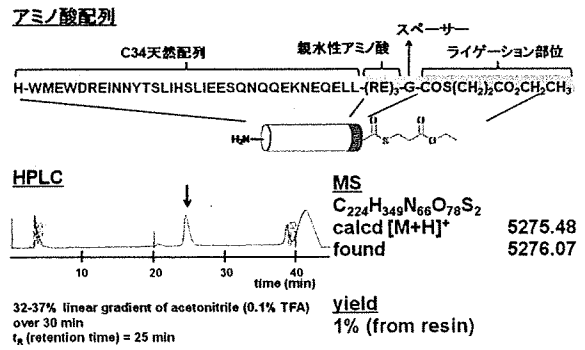


図 3 親水性領域を付加した gp41 の C34 誘導体の合成

C34 3量体の構築

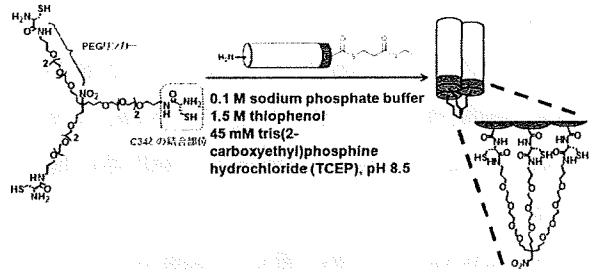


図 4 親水性領域を付加した gp41 の C34 の 3 量体を提示する人工抗原分子の合成

2) gp120 の CD4 binding/ コレセプター binding 領域を抗原として抗体誘導の検討

長期末発症の HIV 感染者の間で中和抗体のエピトープとして高く保存されている、gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の断片ペプチドを、環化と構造固定化のコンセプトを用いて、前年度までに分子設計し、合成した(図 5 右)。コントロールとして鎖状ペプチドも合成し、抗原分子を作製している(図 5 左)。前年度までにマウスおよびウサギを用い、抗体誘導を検討したが、効率よく抗体誘導できなかった。そこで、この抗原分子に特異的に結合する抗体を得るため、ファージディスプレイライブラリーから in vitro アフィニティー選択を行い、得られたクローンをもとにモノクローナル抗体を作製した。

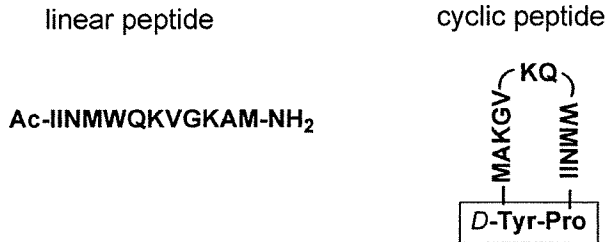


図5 化学合成した gp120 の CD4 binding/コレセプター-binding 領域の鎖状ペプチド(左)とそれを環化した分子構造(右)

3) コレセプター CXCR4 の細胞外ループ (Ec11-Ec13 & N 端) を基にした抗原分子作製 & 抗体誘導

コレセプターであるケモカイン受容体 CXCR4 の細胞外ループ (Ec11-Ec13 & N 端) のみを合成し、Ec1 については環化し、MAP 等に導入する。

まず、CXCR4 の N 端に関しては図 6 のように 3 つの断片に分割して (10 残基オーバーラップさせて)、合成した。各フラグメントは親水性領域を付加した MAP テンプレート上に構築し、抗原分子とした (図 7)。これらをマウスに免疫する。

③ CXCR4 N末端を基にした抗原ペプチドのデザイン

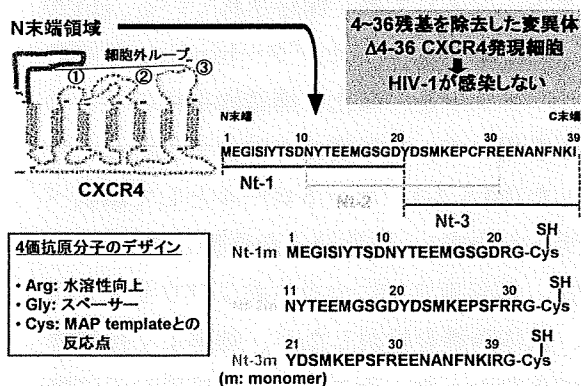


図6 CXCR4 の細胞外ループ (Ec11-Ec13) & N 端ペプチド

③ Nt-1モノマーおよびテトラマーの合成

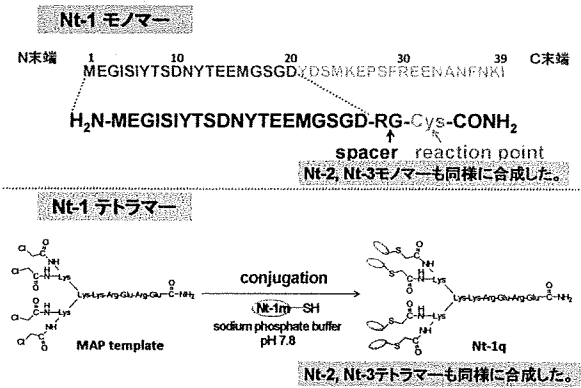


図7 CXCR4 の N 端ペプチドを提示した抗原分子の合成

Ec1 に関しては、水溶性の低さを改善するため、図 8 のように親水性領域 Arg-Glu-Arg-Glu を天然型配列の両端に付与した。また、合成法は 2 種の方法を採用した。一つめの方法は、Cys を 2 個導入し、1 個は通常の脱保護条件で切断されないように Ac_m 基で保護した。N 末端にクロロアセチル基、C 末端に Cys (Trt) を導入する形でペプチド鎖を構築し、脱樹脂と脱保護後、Cys のチオール基とクロロアセチル基の反応により環化し、AgOTf によりもう 1 個の Cys の Ac_m 基を脱保護し、チオール基が 1 個フリーの形の環状ペプチドを生成する。これを用いて同様に MAP-テンプレートに導入する (図 8)。二つめの方法は、Fmoc 固相合成法でペプチド鎖を構築し、脱樹脂後、アミド結合により環化し、側鎖の保護基の脱保護をした。生成した環状ペプチドには、導入しておいた Cys のチオール基があり、これを用いて MAP-テンプレートに導入する (図 9)。

MAP の各先端のアミノ基にクロロ (プロモ) アセチル基を導入し、チオール基を有する環状ペプチドを導入する (図 10)。

③ Cyclic CXCR4 Extracellular Loop 1 (Ecl1)の合成

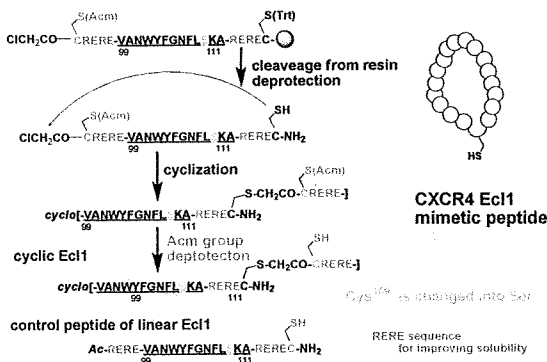


図 8 親水性領域を付加した CXCR4 の細胞外ループの合成

③ Cyclic CXCR4 Extracellular Loop 2 (Ecl2)の合成

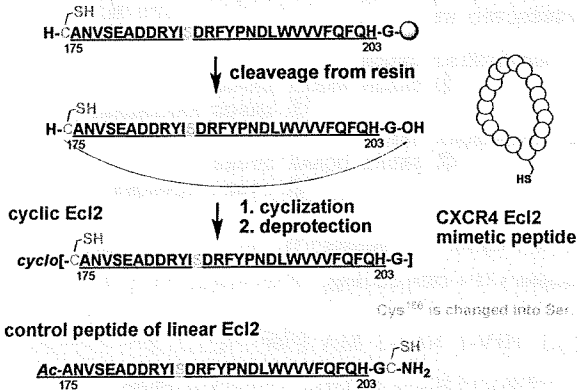


図 9 アミド結合により環化した CXCR4 の細胞外ループの合成

③ Cyclic CXCR4 Eclを提示する多価型人工抗原の合成

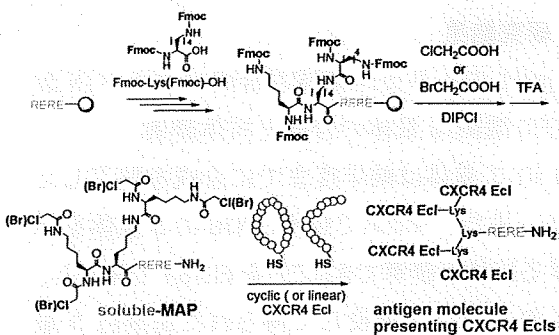


図 10 Ecl1-Ecl3 & N 端ペプチドを提示する人工抗原分子の合成

4) CD4 mimic 誘導体の合成と抗 HIV 活性の評価および中和抗体等との併用効果および CD4 mimic と T140 との hybrid の合成

NBD-556 に関して、今年度は 2 級アミンの窒素原子に種々の置換基を導入し、構造活性相関研究を行った。合成した化合物の各種 HIV 株に対する抗ウイルス活性を CCR5/PM1 細胞を用いて MTT assay で評価した。FACS 解析により抗 V3 抗体 (KD-247) や CD4 induced 抗体の envelope への反応性の変化を sCD4 と NBD-556 で比較した。また、細胞毒性を MTT assay で調べた。上述の 2 級アミンの窒素原子に種々の置換基の導入の効果を参考にして、リンカー長を 3 種類変えて CD4 mimic と T140 との hybrid を合成した (図 11)。

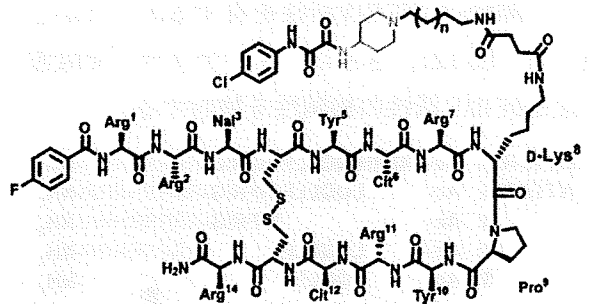


図 11 CD4 mimic と T140 との hybrid の構造

5) インテグラーゼ阻害剤

HIV の Vif 以外の全構成蛋白質由来の部分ペプチドライブラリー (12-15 残基の長さで、7 残基ずつオーバーラップした、合計で 658 個からなるペプチドライブラリー) を 16 個のペプチドプールに均等に分ける。そのペプチドプールをインテグラーゼの酵素阻害活性でスクリーニングする。活性がヒットしたペプチドプールについて、プールに含まれるペプチドをすべて合成し、1 個ずつアッセイをする。このようにして

活性を有するリードのペプチドを見つける。また、阻害活性を有するアミノ酸配列モチーフを探索する。現在、preliminary な結果ではあるが、Vpr 由来の 6 アミノ酸残基配列モチーフを有するリード化合物を得ている。さらに、他の蛋白質由来の部分ペプチド群からも、リード化合物とアミノ酸配列モチーフの探索を進める。見つかったリード化合物については、アラニンスキャン(置換)とアミノ酸削除(deletion)により、活性発現に必須なアミノ酸を同定する。さらに、これらのデータを基に、アミノ酸置換等によりさらなる高活性、かつ低分子のインテグラーゼ阻害剤へ導く。これら合成ペプチドがインテグラーゼの阻害活性を有するかどうか試験する際、インテグラーゼの strand transfer を指標にしたアッセイをする。また、細胞膜透過シグナルである Octa-Arg(Arg 8 残基のペプチド、Futaki S, et al. *J. Biol. Chem.*, 276(8), 5836-5840, 2001)を付加した合成ペプチドが細胞内で抗 HIV 活性を有するかどうかを調べる(図 12)。さらに、インテグラーゼ阻害活性と抗 HIV 活性の相関性を検討する。



図 12 細胞膜透過性ペプチドを付与した LQQLF モチーフペプチド

6) マトリックス蛋白のペプチド断片
 マトリックス(MA)蛋白は、MA 同士の相互作用、あるいは他の蛋白質との相互作用によりウイルス粒子を形成するので、複製をコントロールしていると考えられている(Cannon PM, et al. *J. Virol.*, 71(5), 3474-3483, 1997)。この MA の蛋白質相互作用をターゲットとし、抗 HIV

活性を有するペプチド配列を探索する。MA は 132 個のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、主に α -ヘリックス構造から構成されていることから、部分ペプチドは α -ヘリックス構造を保持できるように 15 残基のアミノ酸ごとに分割し、また、分割点に活性モチーフが含まれる可能性を考慮し、部分ペプチドごとに 5 残基のオーバーラップを設け、MA を計 13 個の部分ペプチドとして設計する。さらに、各 MA 部分ペプチドの C 末端に Gly-Cys 配列を追加し、クロロアセチル基を有する細胞膜透過シグナル Octa-Arg を付加し、細胞膜透過性 MA 部分ペプチドライブラリーを構築する(図 13)。

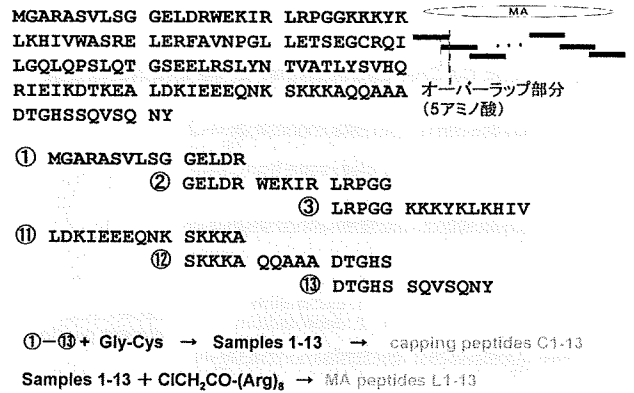


図 13 HIV-1 NL4-3 MA を断片化したオーバーラップペプチドに基づく抗 HIV ペプチドの探索

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の諸内規や作業方式に従って、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

1) gp41 のヘリカル領域の合成ペプチド(N および C 端側)3 量体の合成と抗体誘導
 N36 の 3 量体は前年度までに合成を終了している。また、マウスで免疫し N36 の 3 量体を認識する抗体が誘導できたことを ELISA で確認し、N36 の 3 量体で免役して得られた血清は 3 量体を特異的に認識することを見出している。

その得られた抗体の中和活性を評価したところ、単量体で免疫して得られた血清と比較したところ、強い中和活性が得られた(図 14)。また、人工テンプレートと親水性領域を付加した gp41 の断片(C 端側)C34 peptide (CysGly-ArgGluArgGluArgGlu-C34) を化学合成し、C34 peptide の 3 量体の構築に成功した。HPLC と MS に導入した抗原分子(三量体形成)を同定した(図 15)。また、CD スペクトルを測定し、テンプレート上に 3 個配置させた C34 ではランダムコイル構造の割合が減少した(図 16)。さらに、N36 peptide 存在下で C34 の 3 量体では 6-helical bundle を形成しにくいことが示唆された(図 17)。

誘導された抗体の中和活性

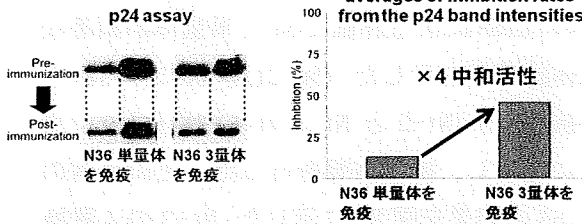


図 14 N36 の 3 量体を提示する人工抗原分子から誘導された抗体の中和活性の評価

C34 三量体の同定

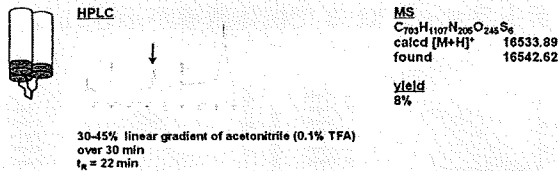


図 15 合成した C34 の 3 量体を提示する人工抗原分子の化合物同定(HPLC チャートとマスペクトル)

C34 三量体の二次構造解析(CDスペクトル)

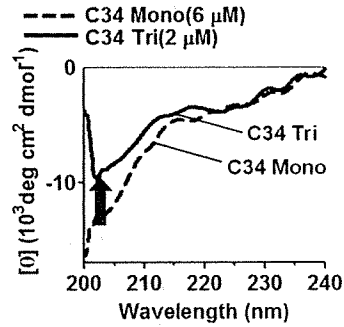


図 16 C34 単量体と C34 3 量体の CD スペクトルの比較

C34 三量体の構造解析(N36との相互作用)

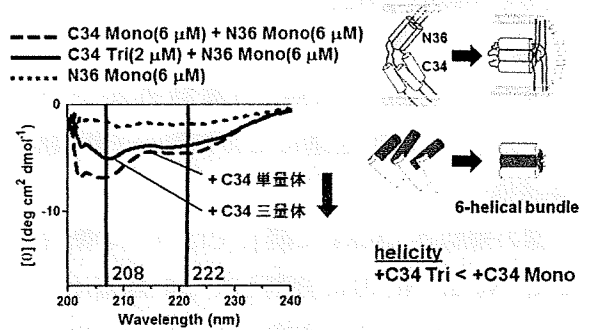


図 17 N36 peptide 存在下での C34 3 量体の CD スペクトル解析

一方、C34 単量体の抗体誘導試験において C34 単量体は十分な抗体誘導能を示した(図 18)。

C34 単量体の抗体誘導試験

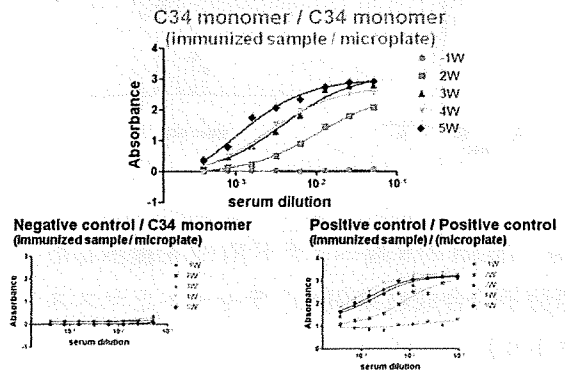


図 18 C34 単量体の抗体誘導試験