

学 位 論 文 題 名

ヒト型 HLA-DQ6 マウスに抗 HIV-1 中和抗体
を誘導するペプチドワクチン

学位論文内容の要旨

はじめに

ヒト免疫不全ウイルスタイプ 1 (HIV-1) のエンベロープ蛋白 gp120 上の V3 ループは、中和エピトープとして働くことが判明している。さらに、この部分には非常に良く保存された 4 残基のアミノ酸 (GPGR) が存在し、この保存された部分だけに反応する抗体を誘導できれば、多種類の変異株の中和に有効と考えられる。

我々の提唱するカセットセオリーによれば、病原体由来の任意のペプチドを MHC 分子結合性コンポーネントに挿入することによりクラス II 分子と結合させ、そのペプチド特異的ヘルパー T 細胞の誘導が可能となる。我々の使用した MHC 分子結合性コンポーネントは、いくつかの HLA-DR 分子、HLA-DQ6 分子にも結合すると推測され、カセットセオリーに基づいて作成されたペプチドワクチンは、ある種の HLA 分子を持つヒトに対して有効である可能性が考えられる。

今回、HIV-1 B 型のコンセンサス V3 領域 (IGPGRAF) をこの MHC 分子結合性コンポーネントに挿入して、ペプチドワクチン 46F/J2/54A を作成した。また 46F/J2/54A の C-末端に IGPGRAF をさらに付加したペプチドワクチン 46F/J2/54A/J2 も作成した。次に、これらのワクチンが、実際ヒトにおいて有効であるかどうかを解析するために、ヒト HLA-DQ6 トランスジェニック (Tg) マウスとクラス II ノックアウト (KO) マウスを交配して、MHC クラス II 分子として HLA-DQ6 分子のみを発現する DQ6 マウスを作成し、ヒトのモデル動物とした。ペプチドワクチン 46F/J2/54A または 46F/J2/54A/J2 で DQ6 マウスを免疫したところ、HIV-1 の B 型だけでなく、東南アジア諸国を中心に多く見られる E 型も中和する抗体が得られた。従って、このペプチドワクチンはアジアにおける母子間の垂直感染の防止に効果があると期待される。

材料と方法

マウス; DQ6 マウスは、DQ6 Tg マウスとクラス II KO マウスを交配し、脾細胞を FACSscan®でスクリーニングして得た。

ペプチドワクチン; ペプチドは、PSSM8 (島津製作所, 京都) で合成した後、HPLC にて精製した。細胞とウイルス; TNIH-022, HOT-045, TNIH-047, 及び TNIH-055 は、血清学的に HIV-1 E 型であり、タイ国エイズ患者より分離した。感染細胞 MOLT/IIIB, MOLT/LAI は、MOLT-4#8 に HIV-1 実験室株 IIIB または LAI を感染させて得た。PBMC (末梢血単核細胞) は正常ヒト成人末梢血より得た。

免疫; マウスを complete Freund's adjuvant (CFA) と共にペプチドワクチン (50nmol) で免疫した。次に、3 週ごとに 2 回、マウスを incomplete Freund's adjuvant (IFA) と共にペプチドワクチン (50nmol) で免疫し、最終免疫より 3 または 4 日後に血清を得た。集めた血清は 56°C、30 分で非働化した。

T 細胞増殖反応; DQ6 マウスをペプチドワクチン (20nmol) で免疫して、7-10 日後に T 細胞画分を回収した。T 細胞画分 (4×10^5 /well) と放射線照射した抗原提示細胞 (APC) (1×10^5 /well) 及びペプチドを 96 穴プレートで 3 日間培養後、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みを測定した。

ELISA; ペプチドを 96 穴プレートに固相化後、5% skim milk でブロッキングした。ウェルを洗浄し、階段希釈した血清を加えた。ウェルを洗浄し、peroxidase 標識ヤギ抗-マウス IgG を加えた。再度ウェルを洗浄し、 α -phenylenediamine を加えて 492 nm で吸光度を測定した。

ウイルス活性測定; ウイルス活性は、感染細胞培養上清中の逆転写酵素活性にて判定した (RT assay)。imaging analyzer (BAS-1000) で測定し、photostimulative luminescence (PSL) で表した。B 型実験室株の感染抑制実験; MOLT-#8 と、MOLT-#8/IIIB または MOLT-#8/LAI を、10 対 1 で混合し、階段希釈したマウス血清とともに 96 穴プレートで 24 時間培養した。

E 型臨床株の感染抑制実験; 階段希釈したマウス血清と、ウイルス溶液を混合し、PBMC を加えて 96 穴プレートで培養した。2 または 3 日毎に 100 μ l の培養上清を回収した。

結果と考察

1. ペプチドワクチン投与 DQ6 マウスにおける T 細胞増殖反応

46F/J2/54A/J2 は、46F/J2/54A/J2、46F/J2/54A で免疫して得た T 細胞いずれに対しても、46F/J2/54A よりも強い反応を誘導した。しかし、ウイルス由来のコンセンサス配列 V3J は、DQ6 マウスに T 細胞反応を惹起しなかった。これらの結果から、作成したペプチドワクチンが HLA-DQ6 と結合し、有意の T 細胞増殖反応を誘導する事が判明した。

2. DQ6 マウスから得られた抗血清の中和活性

46F/J2/54A で免疫して得られた抗血清中には、46F/J2/54A/J2 で免疫したものよりわずかに多い V3J 結合性抗体量が検出された。また、エピトープ部分が異なるコントロールの 46F/HA127-133/54A (18mer) に対しては、いずれの抗血清も反応しなかった。この結果からペプチドワクチンで免疫して得られた抗体は、主として挿入した V3 コンセンサスに結合する事が判明した。

次に抗血清が *in vitro* で HIV-1 を中和できるかを検討した所、HIV-1 B 型の実験室株 IIIB あるいは LAI の増殖を抑制した。46F/J2/54A/J2 で DQ6 マウスを免疫して得られた抗血清は、46F/J2/54A と比較して、より効果的に IIIB 増殖を抑制した。

3. 抗血清による臨床株の中和実験

HIV-1 B 型の V3 ループに保存された配列 (GPGR) と、HIV-1 E 型に保存された配列 (GPGQ) は類似しているため、HIV-1 E 型陽性のタイ人患者 4 人から臨床株を分離して、抗血清による中和実験を行った。

通常、V3 ループに対するモノクローナル抗体は、実験室株に対しては広い反応性を示すが、臨床株に対する中和活性は低いか、もしくは無いと報告されている。しかし、今回作成した抗血清は正常 DQ6 マウス血清と比較して、ウイルスの増殖を有意に抑制した。またここでも、46F/J2/54A/J2 で誘導した抗血清が、46F/J2/54A で誘導した抗血清よりも中和活性が強かった。以上の結果から、DQ6 マウスを 46F/J2/54A/J2 または 46F/J2/54A で免疫して得られた抗血清は、種々の HIV-1 を中和することが示唆された。また、これらのペプチドワクチンが、HLA-DQ6 陽性のヒトに HIV-1 に対する液性免疫を誘導する可能性も示唆された。

HIV-1 の効果的な排除には、細胞性免疫が必須であるが、今回のペプチドワクチンには、過去の実験結果から考えると CTL の誘導能はないと思われる。しかし、HLA-DQ6 分子の分布がアジア人に多いことを考えると、アジアにおける垂直感染の防止に効果があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 生 田 和 良

副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

ヒト型 HLA-DQ6 マウスに抗 HIV-1 中和抗体 を誘導するペプチドワクチン

ヒト免疫不全ウイルスタイプ1 (HIV-1) のエンベロープ蛋白 gp120 上の V3 ループは、中和エпитープとして働くことが判明している。さらに、この部分には非常に良く保存された4残基のアミノ酸 (GPGR) が存在し、この保存された部分だけに反応する抗体を誘導できれば、多種類の変異株の中和に有効と考えられる。

申請者らの提唱するカセットセオリーによれば、病原体由来の任意のペプチドを MHC 分子結合性コンポーネントに挿入することによりクラス II 分子と結合させ、そのペプチド特異的ヘルパーT細胞の活性化が可能となる。申請者の使用した MHC 分子結合性コンポーネントは、いくつかの HLA-DR 分子、HLA-DQ6 分子に結合するスーパーモチーフを含んでおり、ある種の HLA 分子を持つヒトに対して有効である可能性が考えられる。

そこで、HIV-1 B 型のコンセンサス V3 領域 (IGPGRAF) をこの MHC 分子結合性コンポーネントに挿入したペプチドワクチン 46F/J2/54A と 46F/J2/54A の C-末端に IGPGRAF をさらに付加したペプチドワクチン 46F/J2/54A/J2 を作成した。またヒトでの反応を推測するために、ヒト HLA-DQ6 ドランスジェニック (Tg) マウスとクラス II ノックアウト (KO) マウスを交配して、MHC クラス II 分子として HLA-DQ6 分子のみを発現する DQ6 マウスを作成し、これらを用いペプチドワクチンの効果を調べた。

46F/J2/54A/J2、46F/J2/54A で DQ6 マウスを免疫して得た T 細胞は、いずれの抗原ペプチドに対しても反応性を示した。ただし、46F/J2/54A/J2 が 46F/J2/54A よりも強い反応を誘導した。しかし、ウイルス由来のコンセンサス配列 V3J は、DQ6 マウスに T 細胞反応を惹起しなかった。これらの結果から、作成したペプチドワクチンが HLA-DQ6 と結合し、有意な T 細胞増殖反応を誘導することが判明した。

46F/J2/54A/J2 で免疫して得られた抗血清中には、46F/J2/54A で免疫したものよりわずかに多い V3J 結合性抗体量が検出された。また、抗原性が異なるコントロールの 46F/HA127-133/54A (18mer) に対しては、いずれの抗血清も反応しなかった。この結果からペプチドワクチンで免疫して得られた抗体は、主として挿入した V3 コンセンサスに結合することが判明した。

次に抗血清が *in vitro* で HIV-1 を中和できるかを検討したところ、HIV-1 B 型の実験室株 IIIB あるいは LAI の増殖を抑制した。46F/J2/54A/J2 で DQ6 マウスを免疫して得られた抗血

清は、46F/J2/54A と比較して、より効果的に IIIB 増殖を抑制した。

HIV-1 B 型の V3 ループに保存された配列 (GPGR) と、HIV-1 E 型に保存された配列 (GPGQ) は類似しているため、HIV-1 E 型陽性のタイ人患者 4 人から臨床株を分離して、抗血清による中和実験を行ったところ、今回作成した抗血清は正常 DQ6 マウス血清と比較して、ウイルスの増殖を有意に抑制した。またここでも、46F/J2/54A/J2 で誘導した抗血清が 46F/J2/54A で誘導した抗血清よりも中和活性が強かった。

以上の結果から、DQ6 マウスを 46F/J2/54A/J2 または 46F/J2/54A で免疫して得られた抗血清は、種々の HIV-1 を中和することが示唆された。また、これらのペプチドワクチンが、HLA-DQ6 陽性のヒトに HIV-1 に対する液性免疫を誘導する可能性も示唆された。HLA-DQ6 分子の分布がアジア人に多いことを考えると、今回のペプチドワクチンはアジアにおける垂直感染の防止に効果があると考えられる。

論文発表に際して、副査の細川教授より、DQ6 マウスの T 細胞の反応性、DQ6 陽性ヒト T 細胞が DQ6 マウス APC と反応するか、DQ6 マウスは HIV 感受性があるのか、ワクチン C 端にエプトープを付加した時、なぜ免疫原性が増強されるのか、生田教授より HIV-B 型ウイルスの V3 ループコンセンサス配列を選んだ理由、インフルエンザワクチンとの効果との差、ヒト T 細胞に対して二次刺激系を試みたか、薬剤治療とワクチンとの違い、主査の小野江より実際臨床レベルでどの程度の効果が期待出来るか等について質問があった。申請者は大概妥当な回答をなし得た。

本論文は、実験にヒトを用いることが不可能なことを克服する手段として、ヒト HLA-DQ6 のみを発現するマウスを用い、独自に開発した抗 HIV ペプチドワクチンが HIV ウイルスに対する中和抗体を誘導することを証明した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。