

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	ヒト免疫不全ウイルス1型の中和抗体からの逃避メカニズムの解析
Author(s)	柴田, 潤二
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11105
Right	

学位論文
Doctor's Thesis

ヒト免疫不全ウイルス 1 型の中和抗体からの逃避メカニズムの解析

(Analysis of acquiring neutralization resistance of human
immunodeficiency virus type 1 against neutralizing antibodies)

柴田 潤二

Junji Shibata

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻病態制御学

指導教員

松下 修三 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻病態制御学

2008年3月

学位論文

Doctor's Thesis

論文題名 : ヒト免疫不全ウイルス 1 型の中和抗体からの逃避メカニズムの解析
(Analysis of acquiring neutralization resistance of human immunodeficiency virus type 1 against neutralizing antibodies)

著者名 : 柴田 潤二
Junji Shibata

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻病態制御学
松下修三 教授

審査委員名 : 感染防御学担当教授 原田 信志

ウイルス制御学担当教授 滝口 雅文

免疫識別学担当教授 西村 泰治

免疫学担当教授 阪口 薫雄

2008 年 3 月

目次

1. 要旨	1
2. 発表論文	3
3. 謝辞	4
4. 略語一覧	5
5. 研究の背景と目的	6
6. 実験方法	8
7. 実験結果	15
8. 考察	25
9. 結語	30
10. 参考文献	31
11. 図表およびその説明	38

1. 要旨

(目的)

我々の研究室ではヒト免疫不全ウイルス (HIV: Human Immunodeficiency Virus) の外被糖タンパク gp120 の主要中和領域である V3 領域を認識するヒト型中和単クローン抗体 (KD-247) を、(財) 化学及血清療法研究所との共同研究で開発した。KD-247 をサルに受動免疫した実験では、サル-ヒトキメラ免疫不全ウイルス (Simian-Human immunodeficiency virus:SHIV) の感染を完全に抑制することが確認され、in vivo における有効性が確認された。KD-247 は現在、米国で臨床試験中であるが、このような抗体を感染症例に投与した場合、中和抵抗性ウイルスの出現が予測される。一方、これまで CCR5 をコレセプターとする R5 株にどのような中和エスケープが誘導されるのかは不明であった。今回我々は、KD-247 存在下で出現してくる中和抵抗性ウイルスを in vitro の系を用いて誘導し、中和抵抗性に関与する変異の同定と解析を行った。

(方法)

T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い、CCR5 指向性(R5)のクローンウイルスである JR-FL および R5 の臨床分離株 MOKW を用い、KD-247 の濃度を段階的に上げることで KD-247 抵抗性ウイルスを誘導した。得られたウイルスのエンベロープタンパク(Env)gp120 領域のシークエンスより、中和エスケープに関与する変異部位を同定し、この変異を持つ pseudovirus を作製して中和実験を行った。アミノ酸変異が抗体の結合活性に与える影響を ELISA やフローサイトメーターを用いて調べた。また、変異を含む gp120 と変異を含まない gp120 の両方をもったヘテロ三量体 Env をもつ pseudotype virus を作製し、変異が三量体 Env 内でのエピトープの露出に影響するかどうかを中和実験で確かめた。

(結果)

JR-FL を用いた場合、低濃度の KD-247 存在下では中和抵抗性変異を誘導できなかったが、高濃度 (>1000µg/ml) の KD-247 存在下で V3-tip に変異 (G314E) を持ったウイルスが誘導された。G314E ウイルスは KD-247 には中和抵抗性であったが、これ以外の中和抗体に対して中和感受性になることを見出した。R5 の臨床分離株 MOKW を用いた場合、低濃度の抗体存在下では V2 領域に変異を持ったウイルスが増殖し、高濃度の抗体存在下 (>1000 µg/ml) で初めて V3 の変異 (G313L) が誘導され、段階的に中和抵抗性を獲得することが明らかとなった。一方、KD-247 非存在下で継代したウイルスが、ほとんどの抗体に対して感受性になっており、V2 領域に変異を持っていたことから、V2 領域による中和感受性変化のメカニズムを詳しく調べた。その結果、V2 領域の 1 アミノ酸変異(L175P)により、抗 V3 抗体、CD4 結合領域抗体(CD4bs 抗体)、さらには CD4 誘導エピトープ結合抗体 (CD4i 抗体) に対して著しく中和感受性に変えることを見出した。この変異は単量体 gp120 への抗 V3 抗体結合活性はほとんど変えないが、三量体内の隣接した gp120 のエピトープを露出させる働きがある変異であることがわかった。

(考察)

V2 領域は抗 V3 抗体のエピトープとは異なった場所であり、その変異による中和感受性変化

のメカニズムを解明することは中和抗体誘導ワクチンを目指すうえでも大変意義深いものである。本研究は HIV が V2 領域のように吸着・侵入といった感染のステップには直接役割を果たさないと考えられている領域を変異させることにより、エンベロープ三量体構造を変化させ、中和抗体から逃れている可能性を示した。この Env の三量体構造が中和抵抗性を決定するのに重要な要素であり、今後 V2 領域を含んだ gp120 の立体構造解析、ならびに三量体 gp120 の詳細な解析を行うことで、中和抗体誘導ワクチンや受動免疫中和抗体の開発に重要な知見が得られると思われる。

2. 学位論文の骨格となる発表論文、および過去の発表論文リスト

- ①. **Junji Shibata**, Kazuhisa Yoshimura, Akiko Honda, Atsushi Koito, Toshio Murakami, and Shuzo Matsushita. Impact of V2 Mutations for Escape from a Potent Neutralizing Anti-V3 Monoclonal Antibody during In Vitro Selection of a Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate. *J. Virol.* **81**: 3757-3768, 2007.
2. Kazuhisa Yoshimura, **Junji Shibata**, Tetsuya Kimura, Akiko Honda, Yosuke Maeda, Atsushi Koito, Toshio Murakami, Hiroaki Mitsuya, and Shuzo Matsushita. Resistance profile of a neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favourable synergism with anti-CCR5 inhibitors. *AIDS.* **20**: 2065-2073, 2006. (Yoshimura K. and **Shibata J.** contributed equally to this work.)

その他の論文

1. Nobuo Sakaguchi, Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, Satoru Fujimura, **Junji Shibata**, Masatake Araki, Tamami Sakamoto, Chiemi Minoda, and Kazuhiko Kuwahara. Generation of High-Affinity Antibody against T Cell-Dependent Antigen in the *Ganp* Gene-Transgenic Mouse. *J. Immunol.* **174** : 4485-4494, 2005.
2. Shuzo Matsushita, Soichiro Takahama, **Junji Shibata**, Tetsuya Kimura, Koichi Shiozaki, Yasuyuki Eda, Atsushi Koito, Toshio Murakami, and Kazuhisa Yoshimura. *Ex vivo* neutralization of HIV-1 quasi-species by a broadly reactive humanized monoclonal antibody KD-247. *Hum Antibodies.* **14** : 81-88. 2005.
3. Terumasa Ikeda, **Junji Shibata**, Kazuhisa Yoshimura, Atsushi Koito, and Shuzo Matsushita. Recurrent HIV-1 Integration at the *BACH2* Locus in Resting CD4⁺ T Cell Populations during Effective Highly Active Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* **195**:716-725, 2007.
4. 柴田潤二, 松下修三 「抗 HIV 中和抗体」 *日本エイズ学会誌*, 第7巻4号 pp161-165 2005年

3. 謝辞

本研究の機会を賜り、ご指導頂きました熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野教授松下修三先生に深く感謝致します。

実験手技・実験計画などについてご指導頂きました熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野助教吉村和久先生、熊本大学医学薬学教育部感染制御学分野教授小糸厚先生、熊本大学医学薬学教育部感染制御学分野助教木村哲也先生に深く感謝致します。

本研究を技術的、精神的な面でサポートして頂きました河波陽子さん、本田晃子さん、畑田万紀子さん、池田輝政さん、西田吉辰さん、楢原知里さんに深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、事務的および精神的な面でサポートして頂いた月足美樹さんに深く感謝いたします。

4. 略語一覧

HIV	human immunodeficiency virus、ヒト免疫不全ウイルス
SIV	simian immunodeficiency virus、サル免疫不全ウイルス
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome、後天性免疫不全症候群
LTNP	long term non-progressor、長期非進行者
HARRT	highly active antiretroviral therapy、多剤併用抗ウイルス療法
PBMC	peripheral blood mononuclear cells、末梢血単核球
CTL	cytotoxic T lymphocyte、細胞傷害性 T 細胞
TZM-bl	CD4、CCR5、HIV-LTR- β galactosidase、HIV-LTR-luciferase をトランスフェクトした HeLa cell line
GHOST-hi5	CD4、CCR5 トランスフェクトした骨肉腫細胞由来 HOS 細胞
MAb	monoclonal antibody、単クローン抗体
GFP	green fluorescence protein、緑色蛍光タンパク
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose 50%組織培養感染濃度
IC ₅₀	50% inhibition concentration 50%阻害濃度

5. 研究の背景と目的

後天性免疫不全症候群（AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome）の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV: Human Immunodeficiency Virus）の感染拡大は、今なお地球規模で深刻な問題となっている。そのため、感染を防止するワクチンの開発が世界各国で行われているが、実用化には至っていない。

HIV エンベロープタンパク（Env）は、標的細胞の受容体（CD4、CCR5、CXCR4 など）と反応する糖タンパク gp120 と、標的細胞との膜融合に重要な gp41 の二つのサブユニットから構成されており、ウイルス膜表面では三量体構造を形成している（4、29）。HIV に対する中和抗体は gp120、gp41 を認識し、HIV の感染、増殖を阻害する（72）。中和メカニズムの研究は未だ不十分ながら、作用点は以下の2点と考えられている。①gp120 と結合し、標的細胞上の受容体との相互作用を阻害する。②gp41 と結合し、膜との膜融合過程を阻害する。チンパンジーや、急性感染期の感染者に中和抗体を受動免疫した研究では、感染の阻止、ウイルスの複製抑制、病態進行の遅延などの役割を果たすことが示され、中和抗体の *in vivo* での有用性が示された（7、58）。また、HIV に感染しながら未治療でも AIDS を発症しない長期非進行者（LTNP: Long Term Non-Progressor）が存在し、その中の一部の人は広範囲の HIV 株を中和する抗体を保持していることなどから（46）、中和抗体は HIV 感染症に対する有力なワクチンに必要であると考えられている。しかし、HIV は多様性に富むウイルスであるため、1) どのようなエピトープに対する抗体を誘導すれば、広範囲な株を中和できるか、2) どのような抗原を用いれば、効果的に中和抗体が誘導できるか、3) 中和抵抗性ウイルスはどのようにして抵抗性を獲得するかなど、ワクチンとしての中和抗体を誘導するためには解決しなければならない問題が数多く残されている。

抗 HIV 中和抗体のエピトープの一つに gp120 の V3 領域がある（35）。gp120 は loop 構造を形成する variable region（V1-V5）とそれ以外の conserved region（C1-C5）で構成されている（29）。V3 領域は標的細胞に感染する際、コレセプター（CCR5 または CXCR4）との結合に重要な領域であり、HIV 感染者の約半分がこの領域を標的とした抗体を保持していると考えられている（41）。最近発表された gp120 の立体構造解析により、V3 領域は gp120 のコア領域から突き出した構造をしていることが明らかとなり、この構造が *in vivo* で高免疫原性の理由であると考えられている（20）。しかし多くの臨床分離株はエピトープを保持していながら、V3 領域や gp120 の他の領域に結合する中和抗体に対して抵抗性であることが報告されており、これが中和抗体誘導ワクチン開発を複雑なものにしている（40、49、53）。アスパラギン結合糖鎖（N-linked glycan）によるエピトープの遮蔽、V 領域アミノ酸数の増加による遮蔽、多量体 gp120 の四次構造によるエピトープの遮蔽、CD4 結合前・結合後に立体構造を変化させることによる立体構造遮蔽（conformational masking）などの報告があるが、どのような抗体がどのようなメカニズムの中和抵抗性を引き起こすのか、その因果関係は証明されていない（6、12、28、37、47、48、52、62）。

我々の研究室では広範囲な株を中和できるヒト型中和単クローン抗体 (KD-247) を、(財) 化学及血清療法研究所との共同研究で開発した (11)。KD-247 は gp120 の V3 領域を認識する中和抗体である。異なったサブタイプで比べた場合、V3 領域は変異の多い領域として知られているが、同一サブタイプでは V3 の頂点部位 (tip) 周辺のアミノ酸配列は保存されていることから V3-tip は感染に重要な領域であることが推察される。そのことに着目して V3-tip を認識するヒト型抗体を作製した。その結果完成した KD-247 は V3-tip の IGPGR というアミノ酸配列を認識し、日本や欧米で感染拡大しているサブタイプ B のウイルスの約 50% を中和することができ (11、36)、サルに受動免疫した実験では、サルーヒト免疫不全ウイルス (SHIV) の感染を完全に抑制することが確認され、in vivo における有効性が確認された (10)。現在は臨床応用に向けて準備中である。

臨床でこのような抗体を投与した場合、中和抵抗性ウイルスの出現が予測される。そこで本研究では、KD-247 存在下で出現してくる中和抵抗性ウイルスを in vitro の系を用いて誘導し、中和抵抗性に関与する変異の同定と解析を行った。これまでもいくつかのグループにより抗 V3 単クローン抗体を用いて抗体から逃避するウイルスの同定が試みられているが、いずれも感染後期に現れる CXCR4 指向性 (X4) の“実験室株”を使用したものであり、急性・慢性感染期に優位となる CCR5 指向性ウイルス (R5) を用いた報告はほとんどない (9、34、65)。我々はサブタイプ B の R5 クローンウイルスである JR-FL および臨床分離株 MOKW を用いて KD-247 抵抗性ウイルスの誘導を行った。その結果、JR-FL を用いた場合では低濃度の KD-247 存在下では中和抵抗性変異を誘導できなかったが、高濃度 (>1000µg/ml) の KD-247 存在下で V3-tip に変異 (G314E) を持つ中和逃避ウイルスが現れるが、一方、そのウイルスは KD-247 以外の中和抗体に対して中和感受性になることを見出した。また、臨床分離株 MOKW の KD-247 抵抗性ウイルスを誘導した結果、低濃度の抗体存在下では V2 領域に変異を持ったウイルスが現れ、高濃度の抗体存在下 (>1000 µg/ml) で初めて V3 の変異 (G313L) が誘導され、段階的に中和抵抗性を獲得することが明らかとなった。

V2 領域は抗 V3 抗体のエピトープとは異なった場所であり、その変異による中和感受性変化のメカニズムを解明することは中和抗体誘導ワクチンを目指すうえでも大変意義深いものである。今回、V2 領域の 1 アミノ酸変異 (L175P) が、抗 V3 抗体、CD4 結合領域抗体 (CD4bs 抗体)、さらには CD4 誘導エピトープ結合抗体 (CD4i 抗体) に対し、著しく中和感受性に変えることも見出した。この変異により単量体 gp120 への抗 V3 抗体結合活性はほとんど変化しないが、三量体内の隣接した gp120 のエピトープを露出させることがわかった。すなわち、ウイルスが in vivo で V2 領域のように吸着・侵入といった感染のステップにはそれ程重要でないと考えられている領域を変異させることにより、三量体構造を変え、中和抗体から逃れている可能性を示唆している。今後 V2 領域を含んだ gp120 の立体構造解析、ならびに三量体 gp120 の詳細な解析を行うことで、中和抗体誘導ワクチンや受動免疫中和抗体の開発をする上で重要な知見を得られるであろう。

6. 実験方法

1. 細胞株

使用した細胞はヒト腎臓由来 293T 細胞、子宮頸部癌由来 HeLa 細胞に human CD4、human CCR5、HIV-1 LTR- β -galactosidase、HIV-1 LTR-luciferase、を導入した TZM-bl 細胞 (32)、骨肉種細胞由来 HOS 細胞に CD4 と CCR5 を発現させた GHOST-hi5 細胞 (67)、CD4 と CXCR4 を発現させた GHOST-CXCR4 細胞(67)、CD4⁺T 細胞株である PM1 細胞(67)、レトロウイルスベクターにより導入し、CCR5 を高発現させた PM1/CCR5 細胞(67、68)である。

培地に用いるウシ胎児血清 (FCS : Fetal Calf Serum、GIBCO) は補体を非働化するために 56°C で 30 分間熱処理し、0.2 μ m フィルターを通したものを使用した。

293T 細胞および TZM-bl 細胞は 10% の FCS を含んだ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、Sigma)で培養した。GHOST-hi5 および GHOST-CXCR4 は 10% FCS、0.2mg/ml G418 (Sigma)、0.1mg/ml Hygromycin B (Sigma)、1 μ g/ml Puromycin (Sigma)を含んだ DMEM で培養した。PM1 は 10% の FCS を含んだ RPMI 1640 (Sigma)で培養した。PM1/CCR5 は 10% FCS、0.1mg/ml の G418 を含んだ RPMI 1640 で培養した。いずれの細胞も 37°C、5%CO₂ を保つ可湿保温器内で培養した。

2. 抗体、抗ウイルス薬、ウイルス株

抗 V3 抗体 KD-247 (10,11) は (財) 化学及血清療法研究所より提供して頂いた。抗 V3 抗体 447-52D は S. Zolla-Pazner 教授 (Department of Pathology, New York University School of Medicine, New York, NY) より提供して頂いた。抗 V3 抗体 1C10、CD4 binding site (CD4bs) 抗体 3D6、CD4 induced (CD4i)抗体 4C11 はサブタイプ B の HIV-1 に感染後、無治療で現在まで病態が進行していない血友病症例(長期非進行者、Long term non-progressor; LTNP) より分離した B cell を EB ウイルスで cell line 化した細胞から単離した単クローン抗体である (unpublished)。CD4 induced 抗体 17b は J. Robinson 教授 (Department of Pediatrics, Tulane University Medical Center, New Orleans, LA)より提供して頂いた。CD4bs 抗体 IgGb12、F105、抗 gp120 糖鎖抗体 2G12、抗 gp41 抗体 4E10、2F5 は National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program から提供して頂いた。抗 CCR5 抗体 2D7、抗 CD4 抗体 RPA-T4 は BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA)より購入した。ヒト rsCD4 は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)より購入した。CCR5 阻害薬 TAK-779 は武田薬品工業株式会社より提供して頂いた。CCR5 阻害薬 AK-602、SCH-C は小野薬品工業株式会社に合成して提供して頂いた。MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES は R&D Systems, Inc.より購入した。Gp120-CD4 結合阻害剤 NBD-556 は玉村啓和教授 (東京医科歯科大学) に合成して提供して頂いた (55、70)。

CCR5 指向性の HIV-1_{JRFL} (JR-FL) は pJR-FL 5.0 μ g を 293T ヘトランスフェクトし、36 時間後の細胞上清を回収し、0.45 μ m のフィルターを通したあと、使用するまで-150°C で保存した。

CCR5 指向性の臨床分離株 HIV-1_{MOKW} (MOKW) は無治療の日本人から単離してきたウイル

スである(33)。Phytohemagglutinin で刺激した PBMC で継代培養した。その培養上清を 0.45 μ m のフィルターを通したあと、使用するまで-150 $^{\circ}$ C で保存した。

3. PM1 および PM1/CCR5 細胞表面発現レセプターの検出

細胞表面に発現している CD4、CCR5、CXCR4 をフローサイトメーターで検出した。PM1 または PM1/CCR5 細胞を含んだ培養液 0.5ml を FACS tube (Falcon) に加え、1200rpm、4 $^{\circ}$ C、3 分間遠心分離した。上清を吸引し、FACS buffer (2% BSA, 0.02% Azide in PBS; pH 7.23) で 20 倍希釈した抗ヒト CD4-FITC 抗体 (BD biosciences)、抗ヒト CCR5-FITC 抗体 (BD Biosciences)、抗ヒト CXCR4-PE 抗体 (BD Biosciences) または抗ヒト CD19-FITC 抗体 (BD Biosciences)、抗ヒト CD19-PE 抗体 (BD Biosciences) を 50 μ l 加えて 4 $^{\circ}$ C、暗所にて 30 分間保温した。その後、FACS buffer にて 2 回洗浄し、0.5ml の固定液 [2% (w/v) paraformaldehyde in PBS] で固定した。固定したサンプルは、FACSCalibur (Beckton-Dickinson) にて解析した。FITC の蛍光は FL1 で、PE の蛍光は FL2 で検出した。取り込んだデータは Cell Quest (Beckton-Dickinson) にて解析した。

4. KD-247 耐性変異株の単離方法

JR-FL または MOKW は、KD-247 と 50%組織培養感染濃度(TCID₅₀)の 500 倍の濃度のウイルス (500 TCID₅₀)とを混ぜ、30 分間 37 $^{\circ}$ C で反応させた。その後、 4×10^4 の PM1/CCR5 に曝露し、37 $^{\circ}$ C で 5 時間感染させた。その後室温で 1500rpm、5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿した細胞に 10%FCS が含まれる RPMI1640 10ml で懸濁し、培養フラスコ入れ 37 $^{\circ}$ C で培養した。ウイルス増殖は細胞傷害効果 (cytopathic effect; CPE) で確認した (54, 67)。培養して 7 日目で培養上清を回収し、次の継代のウイルス液として使用した。CPE が早くみられるようになったときは KD-247 の濃度を上げた。徐々に KD-247 濃度を上げていき、最終的に JR-FL では 1000 μ g/ml、MOKW では 2000 μ g/ml まで上げた。

5. ウイルス cDNA の増幅とシーケンス反応

培養上清からウイルスを回収し、QIAamp viral RNA kit (Qiagen)を使用してウイルス RNA を精製した。得られた RNA を鋳型にして、High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)と EnvN (5'-CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT-3')を使用して Env 領域の cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型にし、Premix Taq (Ex Taq ver., Takara)と以下に示すプライマーを用い、Nested PCR 法にて gp120 の C1-C4 領域を増幅させた。

1st step: 1B (5'-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA-3')

H (5'-TAGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCC-3')

2nd step: 2B (5'-AGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGA-3')

F (5'-ATATAATTCACCTTCTCCAATTGTCCCTCAT-3')

増幅して得られた gp120C1-C4 領域 DNA 断片は TOPO-TA cloning kit (Invitrogen)のインストラクションに従い、pCR2.1-TOPO vector に挿入し、クローニングを行った。個々のクローンについて、

M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')、M13(-20)Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')、EnvF02 (5'-ATGGTAGAACAGATGCATGA-3')をプライマーとし、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いてABI377 sequencerによりシーケンスを行った。

6. 中和実験 (MTT assay)

96well round-bottom micro culture plateにて、中和単クローン抗体、または抗ウイルス薬存在下/非存在下で100 TCID₅₀のウイルスを2x10³のPM1/CCR5に感染させ、37°Cで7日間培養した。それぞれのwellから100μlの培養液を取り除き、phosphate-buffered saline (PBS)に溶かしたMTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶液 (7.5mg/ml) 10μlを加え、37°Cで3時間インキュベートした。4% Triton X-100 (vol/vol)を含んだacidified isopropanol 100μlを各wellへ加えてformazan crystalを遊離させた。マイクロプレートリーダーにて吸光度(570nm)を測定して、細胞の生存率を算出した。実験は2-3回繰り返した。

7. 変異エンベロープタンパク (Env)発現ベクターの作成

HIV-1_{JR-FL}の(JR-FLwt)エンベロープ発現ベクターpCXN-FLwtは前田洋助准教授(熊本大学医学部薬学教育部感染防御学)より供与して頂いた。JR-FL V3変異体(JR-FL_{G314E})はQuick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene)のインストラクションに従い変異を導入した。導入した変異以外に変異がないことを確認するために、Env003A (5'-AGCAGAAGACAGTGGCAATG-3')、EnvF02(上記参考)、EB2(5'-TCAACTCAACTGCTGTAAAT-3')、EC2F(5'-CCTCAGGAGGGGACCCAGAAATT-3')、EnvF03(5'-TAGCACCCACCAGGGCAAAGA-3')、Nef005B(5'-TTTGACCACTTGCCACCC-3')をプライマーとし、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いてABI377 sequencerによりシーケンスを行った。作製した変異体はpCXN-FL_{G314E}と名付けた。

JR-FLのV2領域の175番目のアミノ酸変異体pCXN-FL(L175P)、pCXN-FL(L175A)、pCXN-FL(L175P)、pCXN-FL(L175F)、pCXN-FL(L175I)はQuick Change site-directed mutagenesis kitを用いて変異を導入した。V2領域175番目(L175P)とV3領域(G312E;EPGR, G314E;GPER)に変異を持ったエンベロープ発現ベクターpCXN-FL(175P+EPGR)、pCXN-FL(175P+GPER)もQuick Change site-directed mutagenesis kitを用いて変異を導入した。

HIV-1_{MOKW}(MOKW)エンベロープ発現ベクターは、pCXN-FLwtベクターより、JR-FLwtエンベロープ遺伝子を切り出し、MOKWエンベロープ遺伝子を挿入して作製した。以下に簡潔に示す。プロウイルスDNAはHIV-1感染PM1/CCR5細胞よりQIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN)を使用して精製した。精製したDNAを鋳型にし、EnvA (5'-GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA-3')とEnvN(上記参考)をプライマーとしてLA Taq(Takara)にてEnv gp160領域を増幅させた。増幅させた断片をpCR-XL-TOPO (Invitrogen)に挿入し、クローニングした。個々のクローンについてM13 Reverse、M13(-20) Forward、Env003A、

EnvF02、EB2、EC2F、EnvF03、Nef005Bをプライマーとし、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kitを用いてABI377 sequencerによりシークエンスを行った。KD-247存在下で誘導された変異部位以外のアミノ酸配列が同一のクローンを選び、制限酵素*EcoRI*によりgp160領域のDNAを切り出し、pCXN2ベクターの*EcoRI*サイトに挿入した。作製したベクターにはpCXN-MOKW-RDP (最後の3つのアルファペットは、V2領域内にある166、167、175番目のアミノ酸を示す)、pCXN-MOKW-KNL/C3m (V2領域変異+C3領域変異体)、PCXN-MOKW-KNL/V3m (V2領域+V3領域変異体)と名付けた。pCXN-MOKW-KNLはpCXN-MOKW-RDPの*StuI*-*Bsu36*領域をpCXN-MOKW-KNL/C3mの同一領域と組み換えることにより得た。pCXN-MOKW-RDP/V3mとpCXN-MOKW-RDP/C3mはpCXN-MOKW-KNL/V3mとpCXN-MOKW-KNL/C3mの*StuI*-*Bsu36*領域をpCXN-MOKW-RDPの同一領域とそれぞれ組み換えることにより得た。pCXN-MOKW-KNP、pCXN-MOKW-RDL、pCXN-MOKW-KDL、pCXN-MOKW-RNLはQuick Change site-directed mutagenesis kitのインストラクションに従い作製した。

8. pseudotype virusの作製

293T細胞をトランスフェクション前日に100mmコラーゲンコートプレート(IWAKI)に 4×10^6 になるように蒔き、37°Cで一晩培養した後、5 μ gのpNL4-3-Luc-ERまたは5 μ gのpSG3 Δ Env (32)、4.5 μ gのエンベロープ発現ベクターおよび0.5 μ gのpRSV-REVベクター (17) をEffectene (QIAGEN)にて添付のプロトコールに従い導入し、37°C、5%CO₂にて培養した。24時間後に上清を回収し、0.2 μ mフィルターに通し、分注して-80°Cにて保存した。ヘテロ三量体化Envを持ったpseudotype virusは任意の2種類のEnv発現ベクターを調整し、合計4.5 μ gのDNA量になるようにして5 μ gのpSG3 Δ Env、および0.5 μ gのpREVベクターをEffecteneにてトランスフェクションして作製した。

得られたシュードウイルスはp24 Antigen ELISA kit (ZeptoMetrix Co.)でp24の抗原量をインストラクションに従い測定した。

9. Single-round中和実験

実験前日にGHOST-hi5細胞またはTZM-bl細胞を平底96ウェル細胞培養用プレート(Falcon)に200 μ lあたり 2×10^4 になるように蒔いた。コンフルエントの70%程度まで増殖したら、200-500TCID₅₀のpseudotyped virusと各濃度の抗体とを10%ウシ胎児血清(FCS)、0.1mg/ml G418、0.05mg/ml Hygromycin-B、5 μ g/ml Puromycin、20 μ g/ml Polybrane (GHOST-hi5の場合)または10% FCS、10 μ g/ml DEAE-dextran (Pharmacia Biotech, TZM-blの場合)を含むDMEMを混合し、15分間氷上で静置した。培養液を除去した標的細胞に100 μ lの抗体/ウイルス混合溶液を加えて37°C、5%CO₂で2時間インキュベートし、ウイルスを標的細胞に吸着させた。その後さらに100 μ lの上記の抗生物質等を含むDMEMを加え、37°C、5%CO₂にて2日間培養した。上清を除去し、PBS (pH 7.4)にて3回洗い、PBSで5倍希釈した30 μ lのLysing buffer (Luc PGC50; 東洋インキ、GHOST-hi5の場合)またはLysing solution (Applied Biosystems、TZM-blの場合)を加え15分間振盪した。そのうち20 μ lを発光測定用のプレート(Coster 3912)へ移し、luciferase基質であるピ

ツカジーン（東洋インキ）を 100 μ l 加え、10 秒後に TR477 microplate luminometer (Applied Biosystems) にて蛍光強度を測定した (GHOST-hi5 の場合)。T2M-bl 細胞の場合は、発光測定用のプレートに移したあと、Reaction buffer diluent で 50 倍希釈した Galacto-Star (Applied Biosystems) を 100 μ l 加え、1 時間暗所にて静置した。その後、TR477 microplate luminometer にて β -galactosidase 活性を測定した。中和活性は、 $\{1-(t-c)/(n-c)\} \times 100$ (t; サンプルの蛍光強度、c; 細胞のみのバックグラウンド蛍光強度、n; 抗体無しサンプルの蛍光強度) で計算した。同じ抗体濃度で 2-3 ウェルにて実験を行い、独立した実験を 2-3 回ずつ行った。

10. エンベロープ発現細胞表面への抗体結合活性の測定

EnvA および EnvN プライマーで増幅させ、pXL-TOPO ベクターにクローニングした gp160 遺伝子を EcoRI にて切り出し、pDNR-1r (Clontech) の EcoRI サイトへ挿入した。インストラクションマニュアルに従い、Cre recombinase (Clontech) を使用し、pLP-IRES2-EGFP へ組み換えた。作製したベクターは pLP-EGFP-JRFLwt、pLP-EGFP-JRFL^{GPER}、pLP-EGFP-JRFL(175P)、pLP-EGFP-JRFL(175F)、pLP-EGFP-JRFL(175I)、pLP-EGFP-MOKW-RDP、pLP-EGFP-MOKW-KNL/C3m、pLP-EGFP-MOKW-KNL/V3m、pLP-EGFP-MOKW-RDP/C3m、pLP-EGFP-MOKW-RDP/V3m、pLP-EGFP-MOKW-KNL、pLP-EGFP-MOKW-KNP、pLP-EGFP-MOKW-RDL、pLP-EGFP-MOKW-KNL、pLP-EGFP-MOKW-RDL である。

0.5 μ g の pRSV-Rev と 4.5 μ g の pLP-EGFP-Env を Effectene transfection reagent で導入し、37 $^{\circ}$ C で 36 時間培養した。DMEM で 2 回洗浄し、剥がれた細胞と FCS を除去後、0.5ml の cell dissociation solution (SIGMA) を加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。倒立顕微鏡で細胞の状態を確認しながら、適当な時間に 10% FCS 入りの DMEM 9.5ml を加え、細胞を懸濁した。細胞を血球計算版で数え、 4×10^5 になるように 5ml FACS 用チューブ (Falcon) に移し、1200rpm、4 $^{\circ}$ C にて 3 分間遠心した。上清を除去後、FACS buffer で最終濃度 10 μ g/ml になるように 5 希釈した抗 Env 抗体を 50 μ l 加えた。30 分間 4 $^{\circ}$ C、暗所に静置した後、FACS buffer で 2 回洗浄し、2 次抗体に 5 μ g/ml の抗ヒト IgG-biotin を 50 μ l 加え、冷暗所 (4 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置した。その後 2 回 FACS buffer で洗浄し、FACS buffer で 1:50 に希釈した strept avidin-PerCP (eBioscience) を 50 μ l 加え、冷暗所 (4 $^{\circ}$ C) で 30 分間静置した。30 分後、FACS buffer で 2 回洗浄し、0.5ml の固定液 [2% (w/v) paraformaldehyde in PBS] で固定した。固定したサンプルは、FACSCalibur (Beckton-Dickinson, San Joes, CA) で解析した。GFP の蛍光は FL1 で、PerCP の蛍光は FL3 で検出した。ベクターを transfect していない細胞の GFP 蛍光をネガティブコントロールとし、GFP 蛍光のある細胞にゲートをかけて、GFP 陽性細胞の抗体結合活性を比べた。取り込んだデータは Cell Quest (Beckton-Dickinson) にて解析した。

11. 単量体 gp120-中和単クローン抗体結合実験

実験は以前から行われている、単量体 gp120-抗体結合実験の方法に従って行った (39, 59)。実験前日、96well polypropyren プレート (Falcon) に CCB buffer (Carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)

で 13.3µg/ml に調整した抗 gp120-C5 sheep 抗体(D7324, Aalto Bioreagents, Dublin, Ireland) 50µl を加え、4℃で一晩静置する。上清を取り除いた後、blocking buffer (2% ウシ血清アルブミン; BSA、0.1% Azide、PBS、pH7.2) 175µl を加え、室温で 30 分間静置する。予め 1% NP-40、10% FCS を含んだ TBS (Tris buffered saline) と pseudotype virus を含んだ培養上清とを 1:1 になるように混合し、室温で 30 分間静置して単量体 gp120 を遊離させる。ELISA wash buffer (0.15% Tween20、PBS pH7.2) で 3 回ウェルを洗浄後、単量体 gp120 を含んだ培養上清を 100µl ずつ加える。2 時間室温に静置した後、ELISA wash buffer で 3 回洗浄し、ELISA buffer (ELISA wash buffer に 1% FCS を加えた) で希釈した単クローン抗体 100µl を加えて室温で 2 時間静置する。ELISA wash buffer で 3 回洗浄し、ELISA buffer で 1000 倍希釈した抗ヒト IgG-Peroxidase 100µl を加えて室温で 1 時間静置する。ELISA wash buffer で 3 回洗浄し、5ml の Substrate buffer (Diethanol amine 48.5ml、MgCl₂ · 6H₂O 0.2g、NaN₃ 0.1g を溶かし、HCl で pH9.85 に合わせ、500ml にメスアップした) に 1 錠の Phospatase substrate (SIGMA) を溶かした buffer 100 µl を各ウェルに加えて室温で 10~30 分 (発色の度合いにより調節) 静置した。発色した段階でマイクロプレートリーダーを使って吸光度 (405nm) を測定した。

12. NL4-3/MOKW env キメラ感染性クローンウイルスベクターの作製

臨床分離株ウイルス MOKW の Env を持った感染性クローンウイルスは、CXCR4 指向性の実験室株 NL4-3 を発現する pNL4-3 (AIDS Research and reference Reagent Program, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) の Env 発現領域と MOKW の Env 領域とを組み換えることにより作製した (27)。まず、MOKW の gp160 をコードしている領域を EnvFv (5'-AGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAG-3') と EnvR (5'-TTTTGACCACTTGCCACCCATCTTATAGC-3') のプライマーペアで、LA Taq を使い増幅した。それとは別に NL4-3 のヌクレオチド 5284 番目から 6232 番目に対応する領域を NL(5284)F (5'-GGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGG-3') と NL(6232)Rv (5'-CTTCGCTCTCATTGCCACTGTCTTCTGCT-3') のプライマーペアを用いて増幅した。この NL4-3(5284-6232)断片には単一の *EcoRI* サイトがある。さらに NL4-3 ヌクレオチドの 8779 番目から 9045 番目に対応する領域を NL(8779)F (5'-GCTATAAGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAA-3') と NL(9045)R (5'-GATCTACAGCTGCCTTGTAAGTCATTGGTC-3') をプライマーとして増幅させた。この NL4-3(8779-9045)断片には単一の *XhoI* サイトがある。MOKW gp160 領域を増幅させた断片と NL4-3(8779-9045)断片を Overlapping PCR 法により結合させ、さらにこの断片と NL4-3(5284-6232)断片を Overlapping PCR 法により結合させた。こうして増幅させた断片を *EcoRI* と *XhoI* で処理し、クローニングベクターである pBluescript SK(+) (Stratagene) の *EcoRI-XhoI* サイトに挿入してシーケンスを行った。その後 *EcoRI-XhoI* 断片を切り出し、pNL4-3 の *EcoRI-XhoI* サイトに挿入した。作製したプラスミドは pNL-MOKW-RDL と pNL-MOKW-KNL と名付けた。

13. NL-MOKW キメラ感染性ウイルスの作製と PM1/CCR5 への感染実験

3 μ g の pNL-MOKW-RDL または pNL-MOKW-KNL を Effectene transfection reagent を用いて 293T 細胞へ transfection した。24 時間後、ウイルスを含んだ上清を回収し、0.2 μ m のフィルターに通した後分注し、-150 $^{\circ}$ C にて保存した。ウイルス量は p24 Antigen ELISA kit で測定した。1x10⁴ 個の PM1/CCR5 細胞と 10ng の p24 量に相当する NL-MOKW キメラウイルスを混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 4 時間保温した。保温後、遠心分離して上清を取り除いた。3ml の 10%FCS を含んだ RPMI1640 に再懸濁し、12 well plate (Falcon) にて培養した。2 系列で実験し、ウイルス増殖は p24 抗原量を測定することにより比べた。独立した同じ実験を 2 回行った。

14. MOKW Env スクレオチド配列アクセション番号

MOKW Env 領域のヌクレオチド配列は DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) に保存してある。そのアクセション番号は AB262847 から AB262951 が継代した MOKW ウイルス Env、AB262952 から AB262961 が Env 発現ベクターの配列である。

7. 実験結果

1. CCR5 指向性 (R5 ウイルス) HIV-1_{JR-FL} を使った KD-247 抵抗性ウイルスの誘導実験

In vitro で R5 ウイルスである HIV-1_{JR-FL}(JR-FL)の KD-247 逃避ウイルスを誘導するために、CCR5 を高発現させた PM1/CCR5 に感染させた。この細胞は T 細胞株 PM1 にレトロウイルスベクターで CCR5 を導入した細胞である (図 1, 68)。CCR5 指向性、CXCR4 指向性のどちらのウイルスにも感染して合胞体を作る。そのため、感染の有無を顕微鏡下で容易に確認できる。

実験方法の章に書いた方法に従い、KD-247 と JR-FL を試験管内で混ぜ、PM1/CCR5 細胞に感染させた。感染して作る合胞体を観察し、合胞体が出来るまでの期間が 1 週間より短くなった場合、KD-247 の濃度を上げた。コントロールとして KD-247 存在下で継代しているウイルスと同じタイミングで KD-247 非存在下にてウイルスを継代した。始めは 1 μ g/ml の KD-247 存在下で JR-FL を感染させ、継代ごとに 5 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml、300 μ g/ml、600 μ g/ml、1000 μ g/ml と濃度を上げていった (図 1)。KD-247 存在下で 8 回継代したウイルスを JR-FL(1000)8P、抗体非存在下で継代したウイルスを JR-FL(-)8P と名付けた。それぞれのウイルスに対する KD-247、CCR5 阻害薬 (TAK-779、SHC-C、AK-602)、抗 CCR5 抗体 (2D7)、抗 CD4 抗体 (RPA-T4)、逆転写酵素阻害薬 (NRTI; ddI、3TC)、プロテアーゼ阻害薬 (PI; NFV、IDV、APV、SQV)、可溶性 CD4 (rsCD4)、CCR5 リガンド(RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β)の感受性を MTT assay で調べた (表 1)。KD-247 の 50%感染阻害濃度 (IC₅₀) で比べた結果、JR-FL(-)8P は 6.8 μ g/ml であったのに対し、JR-FL(1000)8P は 100 μ g/ml でも中和出来ず、16 倍以上中和抵抗性になっていた。JR-FL(1000)8P は KD-247 に対しては中和抵抗性になっている一方、NRTI や PI への感受性はほとんど変わっていなかった。驚くことに、JR-FL(1000)8P は JR-FL(-)8P に比べ、3 つの CCR5 阻害薬 (TAK-779、SHC-C、AK-602)、rsCD4、抗 CCR5 抗体 (2D7)、RANTES に対して感受性になっていた。しかし、その一方で JR-FL(1000)8P は JR-FL(-)8P に比べて抗 CD4 抗体 (RPA-T4) に対して約 3 倍抵抗性に変化していた。これらの結果より、KD-247 逃避ウイルスは KD-247 に対し高度に抵抗性になる一方で CCR5 阻害薬、rsCD4 などに中和感受性になり、反対に抗 CD4 抗体に対しては抵抗性になることが示唆された。

2. KD-247 逃避ウイルスのエンベロープタンパク(Env)領域のアミノ酸配列

KD-247 に対して抵抗性を示したウイルスがどのような変異を獲得した結果、抵抗性になったのかを調べた。ウイルスを含んだ上清からウイルス RNA を回収し、cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として Env gp120 領域の C1-C4 領域を PCR で増幅し、クローニングしてシーケンスした。継代毎に 12-16 クローンをシーケンスした。その結果、V3 領域内の 314 番目のアミノ酸のグリシンがグルタミン酸 (G314E) に変わった変異体が 6 回目の継代 (600 μ g/ml) か

ら見られ (2/13)、7 回目の継代 (600 μ g/ml、10/12)、8 回目の継代 (1000 μ g/ml、12/16) ではその割合が増えていた (図 2)。逃避ウイルスの V3 以外の領域 (C1、V1、V2、C2、C3、V4、C4) にも変異が見られたが、継代を通して維持されている変異は見られなかった。これら V3 領域以外の変異も KD-247 の抵抗性に関与している可能性はあったが、継代を通して維持されておらず、fitness を落としている可能性などがあるので持続的に維持できなかったのではないかと考えられる。一方 KD-247 非存在下で継代したウイルスには G314E のような変異も、その他の領域にも特徴的な変異は認められなかった (図 2、data not shown)。

3. KD-247 逃避ウイルスに見られた G314E 変異が中和単クローン抗体や抗ウイルス薬に与える影響の解析

V3 領域 G314E 変異が KD-247 の中和感受性を変えるのか確かめるため、site-directed mutagenesis 法を用いて、G314E 変異をもつ JR-FL Env 発現ベクターを作製後、pseudotype virus を作製し、single-round replication 実験を行った。Pseudotype virus は NL4-3 発現ベクターの vpr および env 遺伝子をフレームシフトにより欠損させ、nef 遺伝子に luciferase 遺伝子を挿入したベクター (pNL4-3-Luc-ER) と、Rev タンパク発現ベクター (pRSV-Rev)、および JR-FL Env 発現ベクター (pCXN-FLwt または pCXN-FL_{G314E}) を 293T 細胞へトランスフェクションすることにより作製した。Pseudovirus はその遺伝子の一部を欠損させたゲノムしか持っていないため、一度しか標的細胞へ感染出来ない。そのため、標的細胞への感染を阻害する中和抗体などの効果を調べる際、正確に効果を測定することができる。

作製した JR-FL pseudovirus (JR-FLwt または JR-FL_{G314E}) の KD-247 への感受性を比べた結果、JR-FL_{G314E} は KD-247 濃度を 100 μ g/ml まで上げてても抵抗性であった (図 3)。rsCD4、抗 CD4 抗体 RPA-T4、抗 CCR5 抗体 2D7 についても実験を行った。予想通り、JR-FLwt に比べて JR-FL_{G314E} は rsCD4 や 2D7 に対して中和感受性になっており、逆に RPA-T4 に対しては 4 倍ほど中和抵抗性になっていた (図 3)。これらの実験結果は継代したウイルスを使った実験 (表 1) と同様の結果であった。

続いて JR-FL_{G314E} の CCR5 阻害薬 (TAK-779、SHC-C、AK-602) に対する感受性を調べてみた。IC₅₀ の濃度で比べた場合、JR-FL_{G314E} は JR-FLwt よりも TAK-779 に対しては 20 倍、SHC-C に対しては 10 倍、AK-602 に対しては 5 倍感受性になっていた (図 3)。これらの結果も継代したウイルス {JR-FL(-)8P と JR-FL(1000)8P} と一致しており、G314E 変異が引き起こしたことが証明された。

他の中和単クローン抗体の JR-FLwt、JR-FL_{G314E} に対する中和感受性も調べた。使用したのは抗 V3 抗体である 447-52D、CD4 誘導エピトープ結合抗体 (CD4i MAb) 17b である。IC₅₀ で比べた場合、JR-FL_{G314E} は JR-FLwt に比べて 17b には 1.25 倍以上、447-52D に対しては 10 倍感受性になっていた。rsCD4 の併用により 17b の中和感受性が上がることが報告されているが (8)、

1 μ g/ml の rsCD4 存在下の JR-FLwt よりも JR-FL_{G314E} 単独の方が 17b に対して中和されやすかった。

4. JR-FLwt および JR-FL_{G314E} Env 発現細胞表面への抗体結合活性の比較

G314E 変異を持ったウイルスが 17b や 447-52D といった抗体に対して感受性になったメカニズムを解明するため、JR-FLwt または JR-FL_{G314E} (GPER) を発現するベクターを 293T へ transfection し、rsCD4 (0.5 μ g/ml) 存在下/非存在下で各抗体を結合させ、抗体の結合活性をフローサイトメーター(FACS)で調べた。使用した抗体は HIV 陽性感染者由来 IgG、KD-247、17b、447-52D である。図 4 に示す通り、KD-247 は JR-FLwt Env には良く結合しているが、GPER Env には全く結合しなかった。一方、別の抗 V3 抗体である 447-52D は wt、GPER の両方に結合しており、特に変異体 GPER の方に良く結合していた。Mean Fluorescence Intensity (MFI) で比べると、wt が 87.56 であったのに対し、GPER では 219.47 であった。CD4i MAb である 17b は wt Env に対して rsCD4 非存在下ではほとんど結合しなかった (図 4、MFI; 33.21)。中和実験でも rsCD4 非存在下ではほとんど中和しなかった (図 3)。一方 rsCD4 存在下 (0.5 μ g/ml) では 17b の結合活性が上がった (図 4、MFI; 56.61)。しかし、GPER 変異体 Env への 17b 結合活性は rsCD4 存在下の wt Env への結合活性より高くなっていった (図 4、MFI, 97.33)。17b は rsCD4 非存在下でも JR-FL_{G314E} を中和出来 (図 3)、FACS の結果と一致している。これらの結果より、V3 先端 (V3-tip) の G314E 変異は抗 V3 抗体や CD4i 抗体の隠れたエピトープ (cryptic epitope) を露出させうることが示唆された。そのため、GPER 変異体は rsCD4 非存在下でも CD4i 抗体で中和されたり、KD-247 以外の抗 V3 抗体に対して低濃度で中和されたと考えられる。

5. R5 ウイルス MOKW の KD-247 抵抗性ウイルスの誘導

JR-FL はクローンウイルスである。しかし実際の感染者体内では様々な polymorphism を持った亜種ウイルス(quasi-species)が存在している。In vivo での中和抵抗性獲得メカニズムを知るためには、多様な変異を持った臨床分離株を使って中和抵抗性ウイルスを誘導し、解析する必要がある。そこで無治療の日本人感染者から分離し、PBMC で増殖させたウイルス (MOKW) を用いて JR-FL と同様、中和抵抗性ウイルスを誘導した。このウイルスは様々な変異をもったウイルス集団で構成されている。MOKW の KD-247 に対する中和感受性を調べた結果、IC₅₀ で 3.4 μ g/ml であり、R5 ウイルスである Ba-L や JR-FL、また CCR5/CXCR4 両指向性ウイルス(R5X4 ウイルス)である 89.6 と同等の値であった (data not shown)。

KD-247 逃避 JR-FL ウイルスと同様、PM1/CCR5 細胞を標的細胞とし、徐々に抗体濃度を上げることで抵抗性ウイルスを誘導した。PM1/CCR5 細胞に感染して現れる変異を観察するため、コ

ントロールとして KD-247 非存在下で MOKW ウイルスの継代も同時に行った。10 $\mu\text{g/ml}$ の KD-247 存在下から継代を始め、最終的には 2000 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度を上げた (図 5A)。5 回目の継代ウイルス MOKW5p(200)は 200 $\mu\text{g/ml}$ の KD-247 存在下でも増殖でき、9 回目の継代ウイルス MOKW9p(2000)は 2000 $\mu\text{g/ml}$ の KD-247 存在下でも増殖できるようになっていた (図 5A)。それぞれの継代ウイルスと 9 回継代したコントロールウイルス MOKW9p(-)を回収し、MTT assay により KD-247 に対する中和感受性を IC_{50} で比べた (図 5B)。その結果、MOKW9p(-)は 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 、MOKW5p(200)は 16 $\mu\text{g/ml}$ 、MOKW9p(2000)は >100 $\mu\text{g/ml}$ であり、KD-247 の *in vitro* 選択により、KD-247 に対する中和抵抗性を徐々に獲得していることが示された。

6. KD-247 逃避ウイルス Env のシーケンス

KD-247 に対する中和抵抗性を獲得した原因となるアミノ酸変異を探るため、継代毎のウイルス Env gp120 の C1-C4 領域を PCR により増幅させ、クローニングしてシーケンスを行った。方法は JR-FL の時と同じ方法で行った。各継代 6-9 クローンずつをシーケンスし、アミノ酸配列を決定した。

KD-247 による *in vitro* 選択を行う前、MOKW は V2 領域内にいくつかの polymorphism を持ったウイルスが共存していた (図 6)。1 回目の継代後、ウイルス Env の V2 領域には 2 つのアミノ酸変異と C3 領域内に 2 つのアミノ酸変異を持ったウイルスが選択され (図 6、5/9)、V2/C3 変異は抗体濃度を上げるごとにその割合は増えていた (図 6、5/6)。しかしながら、KD-247 存在下で 9 回目の継代ウイルス MOKW9p(2000)の Env には C3 領域の変異は完全になくなり、代わりに 313 番目のプロリンがロイシン(P313L)に変わったウイルスが現れた (図 6、9/9)。一方 V2 領域の変異は維持されていた。KD-247 の反応エピトープは V3 領域の先端(V3-tip)に位置するアミノ酸配列-IGPGR-であり、JR-FL で KD-247 の逃避ウイルスを誘導したときと同様に V3-tip に変異が誘導されたことから、MOKW でも V3-tip に変異が現れることは予測していた (11、67)。その他の C1、V1、C2、V4、C4 といった領域にもいくつかのアミノ酸変異が見られたが、各継代を通して維持される変異は見られなかった。これらの変異も一部 KD-247 からの逃避に関与している可能性が考えられるが、維持される変異ではないため、MOKW を複製していく上では重要でないアミノ酸であると考えられる。

KD-247 非存在下で継代を続けたウイルスでは V3 領域内の P313L といった変異は見られなかった。しかし、KD-247 存在下で見られた V2 領域内の変異とは別の変異である 175 番目のロイシンがプロリン(L175P)になっていたウイルスが増殖していた (図 6、8/9)。この L175P という変異は KD-247 存在下で継代したウイルスには見られなかった。

7. MOKW 変異 Env を持った pseudotype virus の中和感受性

KD-247 により抵抗性ウイルスを誘導した結果、V2、V3、C3 領域に変異を持ったウイルスが

現れた。そこでどの領域の変異が KD-247 に対する中和感受性に影響を与えているのか確かめるため、MOKW9p(-)、MOKW5p(200)、MOKW9p(2000)より Env 領域を PCR で増幅させて Env 発現ベクターを作製し、そのベクターを基に pseudotype virus を作製した(図 7)。それぞれの pseudotype virus を MOKW-RDP、MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL/V3m と名付けた。また、V2 領域の変異、V3 領域の変異、C3 領域の変異を MOKW-RDP のそれぞれの領域と組み換えたキメラ Env 発現ベクターを作製して同様に pseudotype virus を作製し、それぞれを MOKW-KNL、MOKW-RDP/V3m、MOKW-RDP/C3m と名付けた(図 7)。KD-247 に対する中和実験を行い、MOKW-RDP と中和感受性を比べた。IC₅₀ で比べた結果、V3-tip に変異をもったウイルス MOKW-KNL/V3m、MOKW-RDP/V3m は完全に抵抗性になっていた(図 8、表 2、25000 倍以上)。一方、V2 に変異があるウイルス MOKW-KNL/C3m および MOKW-KNL は一部中和抵抗性になっていた(図 8、表 2、MOKW-KNL/C3m; 125 倍、MOKW-KNL; 500 倍)。V1/V2 領域が中和抵抗性に関与しているという報告は他のグループにより示されている(48)。我々の結果も V2 領域に変異を持ち、KD-247 に対して一部抵抗性を持った MOKW が比較的低濃度の KD-247 存在下(10-200 µg/ml)で選択されてきたことを示した。また、高濃度の KD-247 存在下では V3 領域に変異を持ち、完全に中和抵抗性になったウイルスが選択されてくることも示した。

KD-247 に対して中和抵抗性になったウイルスの性質を詳しく調べるため、その他の抗 Env 中和単クローン抗体(抗 V3 抗体 447-52D、CD4i 抗体 17b)、rsCD4、抗 CCR5 抗体(2D7)、抗 CD4 抗体(RPA-T4)、CCR5 阻害薬(TAK-779)に対し、どのような感受性を示すか調べた(図 8、表 2)。V3 領域の P313L に変異を持った KD-247 抵抗性ウイルス MOKW-KNL/V3m、MOKW-RDP/V3m は他の抗 V3 抗体である 447-52D に対して完全に抵抗性であり、V3 変異を持っていない V2 変異ウイルス MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL は一部抵抗性となっていた(図 8、表 2)。この結果は KD-247 と同様であり、抗 V3 抗体に一般的に見られる可能性が高い。rsCD4 や 17b に対し、V2 領域に変異をもったウイルス(MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL/V3m、MOKW-KNL)は V2 領域に変異を持っていないウイルス(MOKW-RDP、MOKW-RDP/V3m、MOKW-RDP/C3m)に比べて抵抗性であった(図 8、表 2)。抗 CCR5 抗体 2D7 や CCR5 阻害薬 TAK-779 に対し、V3 変異 P313L を持ったウイルス(MOKW-KNL/V3m、MOKW-RDP/V3m)は V3 変異の無いウイルスに比べて有意に感受性になっていた(図 8、表 2)。抗 CD4 抗体 RPA-T4 に対する感受性の違いは見られなかった(表 2)。これらの結果より、V3-tip の変異と V2 領域の変異は抗 V3 抗体に対する中和感受性を変え、他のエピトープに対する中和抗体や抗 CCR5 抗体/阻害薬といったものに対する感受性にも影響を与えることを示した。

8. 細胞表面上に発現させた MOKW Env に対する中和抗体の結合活性の比較

V3-tip の変異と V2 領域変異をもったウイルスが中和抵抗性になったメカニズムを解明するため、MOKW Env を 293T 細胞表面上に発現させ、それに対する抗体の結合活性をフローサイトメ

ーターで測定した。KD-247、447-52D、17b に対する結合活性を調べた。図 9 に示すとおり、V3-tip 変異、V2 変異の両方を持っていない Env (MOKW-RDP、MOKW-RDP/C3m) に対する KD-247 の MFI は 30.13、29.20 であった。しかしながら V3-tip に変異がある Env (MOKW-KNL/V3m、MOKW-RDP/V3m) の MFI は 6.90、6.66 であり、コントロール抗体 (健康人 IgG) の MFI とほとんど変わらなかった。V2 変異をもった Env (MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL) の MFI は 17.89、19.18 であり、V2/V3 変異をもった Env よりも結合活性は落ちていた。別の抗 V3 抗体である 447-52D に対しても KD-247 の結合活性と同様の結果が得られた (図 9B)。CD4i 抗体である 17b の結合活性は、V2 変異をもったウイルス Env (MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL/V3m、MOKW-KNL) への結合活性が落ちており、V2 変異を持っていない V3 変異 Env (MOKW-RDP/V3m) では抗体の結合活性には影響を与えていなかった (図 9B)。これらの結果より、V2 領域の変異は V3 抗体だけでなく CD4i 抗体の結合活性にまで影響を与える変異であるということがわかった。抗体のエピトープへの結合活性が中和感受性/抵抗性を決める要因となっていることを示している。

9. 中和感受性を变化させる V2 領域アミノ酸変異の同定

KD-247 は V3-tip に位置するアミノ酸配列-IGPGR-を認識する (11)。そのため、KD-247 はこの領域に変異が入った Env へは結合できず、その結果、V3-tip に変異をもったウイルスを中和出来ない (67)。しかしながら、V2 領域は KD-247 のエピトープではないため、何故 V2 変異により抵抗性になるのか、そのメカニズムはよくわかっていない。KD-247 に対して中和抵抗性を与える V2 アミノ酸変異を明らかにするため、今回得られた V2 変異体が持つアミノ酸変異を単独、または組み合わせで持った pseudotype virus を site-directed mutagenesis 法により作製し、KD-247 の感受性を変えるアミノ酸変異を同定した (図 7)。図 10 に示す通り、KD-247 に対して R166K/D167N 変異体 (MOKW-KNP) は変異を導入していない MOK-RDP とほとんど中和感受性が変わらなかった。驚くことに 175 番目のアミノ酸プロリンをロイシン (P175L) に変えたウイルス MOKW-RDL は $IC_{50}; 100\mu\text{g/ml}$ 以上であり、MOKW-RDP と比べて 10,000 倍以上抵抗性になっていた。R167N/P175L 変異を導入したウイルス MOKW-KDL もまた MOKW-RDL と同じくらい KD-247 に対し抵抗性となっていた。これら二つのウイルス MOKW-RDL、MOKW-KDL は R166K/D167N/P175P の三つのアミノ酸変異をもったウイルス MOKW-KNL よりもむしろ中和抵抗性であった。D167N/P175P をもったウイルス MOKW-RNL も MOKW-KNL に比べて 10 倍程抵抗性となっていたが、MOKW-RDL や MOKW-KNL よりも感受性であった。これらの結果より、175 番目のアミノ酸 (P または L) は KD-247 の中和感受性を変える重要なアミノ酸であり、R166K、D167N のアミノ酸変異は 175L のアミノ酸を含んだ Env である場合に中和感受性を変える働きがあることが示された。

次に V2 変異の組み合わせを持った pseudotype virus に対する他の中和抗体 (447-52D、CD4 結

合領域抗体；CD4bs MAb IgGb12)、rsCD4、2D7、RPA-T4、TAK-779 の感受性を調べた (図 10)。MOKW-RDL と MOKW-KDL は 447-52D、IgGb12、rsCD4 に対しても抵抗性であった。MOKW-RNL は 447-52D、IgGb12、rsCD4 に対し MOKW-KNL と比べて一部抵抗性となっており、MOKW-RDL、MOKW-KDL よりも感受性であった。これらの結果は KD-247 で見られた結果と同じ傾向であった。V2 のどの変異体も TAK-779、2D7 に対しては同様の中和感受性を示した (図 10、data not shown)。しかしながら、MOKW-RDL と MOKW-KDL は抗 CD4 抗体 RPA-T4 に対し、他のウイルスと比べて約 3 倍中和感受性が低かった (図 10)。これらの結果より、175L を持ったウイルスの低下した増殖能を補うために 166/167 番目の変異 (RD から KN) が導入された可能性が高い。一方、175P を持ったウイルスは KD-247 非存在下の PM1/CCR5 細胞では増殖しやすかったため、優位に増殖できたのではないかと考えられる。

10. V2 領域アミノ酸変異を持った単量体 gp120 または三量体 gp120 (細胞表面発現 gp120) への抗体結合活性の解析

V2 領域の変異が引き起こす中和感受性変化のメカニズムを解明するため、単量体 gp120 への抗体結合活性を解析した。Single-round 中和実験で使用した pseudotype virus を界面活性剤入りの緩衝液で処理し、単量体 gp120 を遊離させた。gp120 の C5 領域に反応する抗体を敷いた ELISA プレートで gp120 を捕捉した後、抗 V3 抗体である KD-247、447-52D を反応させて抗体の結合活性を比べた (図 11)。V2 変異を組み合わせた単量体 gp120 への抗体結合活性には差がなかったことから、少なくとも単量体 gp120 では抗 V3 抗体のエピトープは同様な状態で保持されていることが示唆された。

単量体 gp120 とは異なり、細胞表面上に発現した Env には感染性や中和感受性に関連した多量体 gp120 が含まれている。そこで、V2 変異を組み合わせた Env を発現するベクターを transfection し、細胞表面上に発現する三量体 gp120 に対する抗体結合活性をフローサイトメーターを用いて比べた。図 12 A、B に示す通り、MOKW-RDP と MOKW-KNP への KD-247、447-52D、IgGb12 の結合活性はほとんど変わらなかった。MOKW-RDL Env への抗体結合活性は実験した KD-247、447-52D、IgGb12 のどの抗体に対しても一番結合活性が低かった。MOKW-KDL Env への KD-247、447-52D、IgGb12 の結合活性はわずかに MOKW-RDL よりも高かった。MOKW-RNL Env への抗体結合活性は MOKW-KDL よりもわずかに高かった。V2 変異が 3 つとも導入された変異体 MOKW-KNL は、MOKW-RDP と一つまたは二つ変異の入った Env (MOKW-RDL、MOKW-KDL、MOKW-RNL) の中間くらいの結合活性を示した。IgGb12 に対する結合活性のみ MOKW-KNL は MOKW-RDP と同程度だった。これらの結果は図 10 で示した single-round 中和実験の高濃度の抗体に対する中和実験の結果と一致していた。

11. NL-MOKW-RDL と NL-MOKW-KNL の増殖速度の比較

MOKW-RDL ウイルスは MOKW-KNL ウイルスより KD-247 に対し高度に抵抗性であり (図 13)、KD-247 で選択圧をかける以前から V2 領域の 166/167 番目に RD をもったウイルスの方が KN をもったウイルスよりも数多く存在していた (図 6)。それにも関わらず 166K/167N/175L をもったウイルスが KD-247 の低濃度の選択圧により増殖してきた (図 6)。166/167 番目の KN というアミノ酸は 175L の入ったウイルスの PM1/CCR5 における増殖能を補償している可能性が考えられる。166/167 番目のアミノ酸 KN の PM1/CCR5 細胞での増殖能に与える影響を調べるため、175L を含んだ Env に 166/167 番目のアミノ酸 RD または KN をもった Env をもつ増殖能を保持したクローン HIV-1 (NL-MOKW-RDL および NL-MOKW-KNL) を作製して増殖速度を比較した (図 13)。その結果、PM1/CCR5 細胞において NL-MOKW-KNL は MOKW-RDL よりも増殖速度が速かった。これらの結果より 175L を含んだ Env に 166/167 番目のアミノ酸 KN 変異を導入することにより、PM1/CCR5 細胞では増殖に有利に働き、MOKW-RDL よりも増殖速度を速くすることで KD-247 の選択圧から逃れてきたのではないかと考えられる。

12. 中和抵抗性株 JR-FL における V2 領域 175 番変異の中和抗体感受性への影響

R5 ウイルスである JR-FL は比較的中和抵抗性ウイルスであることが知られている (48)。Pinter らは JR-FL と中和感受性株である SF162 の V1/V2 領域を組み換えた結果、中和感受性が入れ替わるという事を見出した。これまでも V1/V2 領域が中和感受性に関与するということが報告されている (25、42、47、48)。しかし、臨床分離株 MOKW で見られたような V2 領域の 1 アミノ酸変異で大きく中和感受性を変えるという報告はない。そこで MOKW でみられたような 175 番目のアミノ酸の変異による中和感受性の変化は、中和抵抗性株 JR-FL でも見られるかどうか確かめるため、site-directed mutagenesis 法を用い、175 番目のアミノ酸に変異を導入した。この 175 番目のアミノ酸 Leu はほとんどの HIV-1 や SIVcpz で高度に保存されているアミノ酸である。頻度は低いですが、フェニルアラニン (F)、イソロイシン (I) も見られる (31)。これらマイナーなアミノ酸も JR-FL へ導入し、中和感受性への影響を確かめた。

抗 V3 抗体 447-52D、KD-247 に対する中和感受性を調べた結果、JR-FL を用いた時も L175P 変異体は JR-FLwt に比べて高度に中和感受性になっていた (図 14、表 3、447-52D : >1406 倍、KD-247 : 1748 倍)。一方、マイナーであるがデータベース上で見られる L175F、L175I 変異体は JR-FLwt とほとんど中和感受性は変わらなかった (図 14)。他の抗 V3 抗体である 447-52D に対しても同様に L175P のみ中和感受性になっていた (図 14、表 3)。これらの結果は MOKW で見られた結果と一致していた。その他のエピトープである CD4i 抗体である 4C11、CD4bs 抗体 3D6、rsCD4、CD4 mimic small molecule である NBD-556 も同様、L175P のみ中和感受性となっていた (図 14)。データベース上には見られないが、アラニン (A) に置き換えた L175A という変異体

の中和感受性を調べたところ、L175P ほどではないが抗 V3 抗体 KD-247 に対して中和感受性になっていた (IC_{50} :KD-247; 0.05 μ g/ml, data not shown)。以上のことから、V2 領域の 175 番目のアミノ酸 (P または A) 変異は、抗 Env 抗体の中和感受性を大きく変える働きをもつアミノ酸変異であることがわかった。

さらに L175P 変異体の中和感受性を調べるため、JR-FLwt と JR-FL(L175P)に対し、様々なエピトープに結合して中和する抗体や長期非進行者 (LTNP) 由来血清を使用して中和実験をおこなった (図 15、表 3)。その結果、抗 V3 抗体 1C10、CD4i 抗体 17b、抗 CD4bs 抗体 F105、LTNP 由来血清に対しても L175P は中和感受性になっていた。抗 gp41 抗体 2F5 に対しては、わずかに中和感受性になっていたが (図 15、表 3、3.68 倍)、別の抗 gp41 抗体 4E10 に対してはほとんど変わらなかった。抗 gp120 糖鎖抗体 2G12 に対しても中和感受性はほとんど変わらなかった。感染標的細胞上のレセプターに結合する抗 CD4 抗体 RPA-T4、抗 CCR5 抗体 2D7、CCR5 阻害薬 TAK-779 に対する感受性も変わらなかった。驚くことに、抗 CD4bs 抗体の F105 に対しては中和感受性が大きく変化していたのに対し、IgGb12 に対する中和感受性は変わらなかった (図 15、表 3)。IgGb12 はエピトープの立体構造遮蔽に影響されにくい抗体として知られており、広範囲な株を中和出来る (28)。その他の CD4bs 抗体とは性質が異なっており (1, 32)、そのため、175 番目のアミノ酸変異に影響されない抗体なのかもしれない。

13. V2 変異 JR-FL 単量体 gp120 および三量体 gp120 (細胞表面発現 gp120) への抗体結合活性の解析

抗 gp120 糖鎖抗体 (2G12) に対する中和感受性には大きな差が無かったため (図 15)、2G12 を用い、ELISA に使用する単量体 gp120 の抗原量を揃えた (図 16)。それらの単量体 gp120 への抗体結合活性を比べた結果、抗 V3 抗体 (447-52D、1C10)、抗 CD4bs 抗体 (3D6) に対する結合活性は中和実験で見られたような大きな差は見られなかった (図 16)。しかし、CD4i 抗体 17b に対し L175P 変異体 gp120 の方が結合活性が高い傾向が見られた (図 16)。一方、広範囲の株を中和することで知られる IgGb12 の結合活性は逆に L175P の方が wt に比べて低かった (図 16)。

細胞表面発現三量体 gp120 への抗体結合活性を比べた結果、L175P 変異 Env への抗 V3 抗体 (447-52D、1C10) 結合活性は大幅に上がっていた (図 17)。また CD4 抗体 3D6、CD4i 抗体 17b の結合活性も L175P の方が結合していた (図 17)。以上の結果より、V2 領域 L175P 変異はウイルス膜表面上の三量体 gp120 における抗 V3 抗体、CD4bs 抗体のエピトープの露出に影響を与える変異であることがわかった。また、CD4i 抗体に対しては単量体 gp120 上での抗体結合活性を上げ、結果として中和感受性が高くなっている可能性が示唆された。

14. ヘテロ三量体 gp120 をもった pseudotype virus への抗 V3 抗体中和感受性の検討

これまでも V1/V2 領域が中和感受性を変化させることが報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていないことが多い (25、42、47、48、50、54)。V2 領域が隣り合った V3 領域のエピトープを遮蔽した結果、V3 抗体に対して中和抵抗性を獲得していると考えられているが (5、30)、ウイルス膜表面上での詳細な三量体構造は未だに明らかにされていない。本研究で明らかとなった V2 領域 L175P 変異を持った gp120 が、三量体内の隣接した gp120 のエピトープの遮蔽に関与しているのかどうか確かめるため、wt と L175P のヘテロ三量体を持った pseudotype virus を作製し、中和感受性を変えるか確かめた。いくつかのグループより 2 種類の Env 発現ベクターを co-transfection することにより、ウイルス表面上にヘテロ三量体を持つ pseudotype virus が産生されることが示されている (16、51)。この方法を使用した場合、pseudotype virus 上には wt ホモ三量体、L175P ホモ三量体、wt と L175P のヘテロ三量体の 3 種類の三量体 Env が発現することが予想される。L175P 変異がヘテロ三量体内の隣接した gp120 のエピトープへの中和抗体活性に影響を与えるか確かめるため、L175P を含んだ gp120 の中和抗体エピトープに変異を入れ、L175P のホモ三量体には抗体が反応しないようにする必要がある。以前、抗 V3 抗体 1C10 で中和抵抗性 JR-FL を誘導した結果、V3-tip のアミノ酸-GPGR が EPGR に変異したウイルスが出現し、1C10 に完全に耐性になることを見出した (data not shown)。この V3 変異体ウイルスは CCR5 阻害薬 TAK-779、抗 CD4 抗体 RPA-T4 に対しても wt と感受性が変わらず、感染性に影響が少ないことが分かっている (data not shown)。そこでこの変異 (G312E) を L175P Env へ導入したベクターを作製し、このベクターと wt Env 発現ベクターを用いてヘテロ三量体 pseudotype virus を作製して中和実験を行った (図 18)。その結果、L175P と V3 変異ホモ三量体 pseudotype virus (L175P /V3m) に対しては全く中和感受性を示さなかったが、wt と 175P/V3m のヘテロ三量体 pseudotype virus (wt + L175P/V3m) に対して 1C10 の中和感受性が上がった。447-52D に対しても同様な結果が得られた (図 18)。以上の結果より、V2 領域 L175P 変異は三量体 Env 内の隣接した gp120 に作用し、V3 エピトープを露出させることが示唆された。

7. 考察

HIV に対する中和抗体の多くは限られた株にしか反応せず (“型特異的”)、HIV の高い変異性のため、簡単に中和逃避の変異ウイルスの出現を起こすと考えられてきた。しかし、これまでの研究の多くは実験室で用いられている X4 株についての解析であり、実際の感染症例で増殖している R5 株に関しての研究はほとんどなかった (9, 34, 65)。ENV は HIV-1 の遺伝子の中でも最も変異の多い場所として知られ、中でも V3 領域は変異が多く中和抗体のよい標的ではないと考える研究者もいる。しかし、ある特定の感染者における V3 の配列を経時的に検討してみると予想に反し、むしろほとんど変異がないという報告もある (60, 62)。本研究で使用している KD-247 が認識する V3-tip のエピトープ-IGPGRA-に関しては cladeB ウイルスの約 50% に保存されているものである (11)。V3-tip はコレセプターである CCR5 との効率のよい相互作用のため配列が保存されている可能性が示唆されている。

KD-247 はエイズの治療薬としての臨床応用に向けて開発中であるが、in vivo で使用した場合、必ず問題になるのが中和抵抗性ウイルスの出現である。我々は KD-247 抵抗性ウイルスを in vitro の系で誘導し、どのような変異が中和抵抗性に関与するのか調べた。その結果、R5 のクローンウイルスである JR-FL を使用した場合、比較的低濃度の KD-247 存在下では変異を持ったウイルスは出現しなかったが、高濃度の KD-247 存在下になると KD-247 エピトープである V3-tip(G314E)に変異を持ったウイルスが出現した。驚くことに V3-tip に変異を持ったウイルスは KD-247 に対しては完全に抵抗性になる一方、その他の抗 V3 中和抗体である 447-52D や CD4i 抗体 17b に対して中和感受性になっていた。また CCR5 阻害剤や CCR5 のリガンドに対しても感受性になっていた。V3-tip 領域は CCR5 の細胞外ループ 2 (Extracellular loop 2; ECL2) に結合することで HIV 感染を促進すると考えられおり、V3-tip に変異が入ると ECL2 との結合能が低下すると報告されている (18)。今回出現した G314E は稀な変異と考えられ、シークエンスデータベース上では確認できなかった (31)。V3-tip の変異により CCR5-ECL2 への結合が弱くなったため、CCR5 阻害薬やリガンドといった拮抗する物質が低濃度でも阻害できるようになり、感受性が高くなったと考えられる。しかし、447-52D や 17b といった抗体に感受性になることは予想外であった。V3-tip のアミノ酸-GPGR-の直前に PM というアミノ酸が挿入された R2 という株は CD4 independent に感染することができ、V3 抗体、CD4bs 抗体、CD4i 抗体、sCD4 に対し中和感受性になることが報告されている (69)。また、V3-tip の GPG というアミノ酸は β ヘアピン構造を形成する際、重要なアミノ酸配列であることがわかっており (72)、酸性アミノ酸の E が入ることにより V3 の構造に影響を与えた可能性がある。最近 Huang らは、gp120 内の V3 stem とケモカインレセプターが結合する bridging sheet と CCR5 の N 末端とが相互作用する際、V3 loop の構造に影響を与えることを見出した (19)。これらのことから総合して考えると、V3-tip の変異が V3 loop そのものの構造を変え、ケモカインレセプター結合領域にまで影響を与えた結果、R2 株と同じように中和感受性へ変化した可能性がある。KD-247 を臨床投与した際、このような中和感受性株が誘導されたとしても、ほとんどの感染者が CD4i 抗体を保持していることを考え

ると(8)、治療の面では逆に有利に働くと考えられる。また、CCR5 阻害薬に対しても高度に感受性になることから、近く臨床で使用される CCR5 阻害薬との併用も効果が期待される (67)。今後も V3-tip 変異 (GPER) を持ったウイルスの詳細な解析を行うことで、KD-247 を臨床応用する際に有益な情報が得られることは間違いない。

様々な変異をあらかじめ持ったウイルス (quasi-species) である臨床分離株 MOKW を用いた実験では、比較的低濃度の KD-247 存在下では V2 領域および C3 領域に変異を持ったウイルスが増殖した。高濃度の KD-247 (>500 µg/ml) 存在下では V3-tip (P313L) に変異を持ったウイルスが出現してきた。これらの変異をもつ pseudotype virus を作製し、中和抵抗性を変化させる領域を同定したところ、低濃度の KD-247 存在下で増殖してきたウイルスは V2 領域の変異で抵抗性を獲得し、高濃度の KD-247 存在下で出現した V3-tip 変異体は KD-247 に対して完全に抵抗性を獲得していることがわかった。このことは、quasi-species を持った臨床分離株では、抗体濃度に応じて段階的に抵抗性変異をもったポピュレーションが選択され、抗体から逃避できることを示している。

V1/V2 領域のアミノ酸は非常に多様な変異を持った領域であり、同一サブタイプだけでなく、同一感染者から分離したウイルス間でも多様性に富んでいる (14, 50, 61, 66)。同一感染者の前期と後期でウイルスを分離してきて Env のシーケンスを比べた場合、後期の V1/V2 領域の方が前期のウイルスに比べて長くなっているなどの報告もある (50)。しかし、いずれも *in vivo* のウイルスを分離して解析した結果であり、直接中和抗体から逃避するために獲得した変異であるのかについては示されていない。本研究では *in vitro* の系を用い、V2 領域の変異が抗 V3 抗体からの逃避に関与していることを初めて示した。多くの研究者が V1/V2 領域が抗 V3 抗体や gp120 内の他のエピトープに結合する抗体、rsCD4 などに対する中和感受性に影響を与えることを報告している (12, 13, 22, 23, 26, 42, 47, 48, 50)。また、V1/V2 領域は単量体 gp120 内では 90° 以上離れた場所に位置している (29)、三量体 Env 内の隣接した V3 領域を覆うことで中和抵抗性になっているとも考えられている (5, 28, 30)。本研究では V2 変異を持った単量体 gp120 への抗 V3 抗体の結合活性が、変異を持たない gp120 への結合活性とほとんど変わらなかったのに対し、細胞膜表面上に発現させた三量体 Env への結合活性は明らかに変化していた (図 9, 図 12)。これらのことから、V2 領域の変異が三量体内の立体構造の変化を誘導し、結果的に gp120 のエピトープの露出を調節することで、中和抗体から逃避させる役割を持っていることを *in vitro* の系を用いて初めて示した。

前半で使用した JR-FL は比較的中和抵抗性であることが知られており、中和感受性株 SF162 との組換え実験から V1/V2 が中和抵抗性に関与していることが示されている (48)。このように JR-FL はもともと中和抵抗性に働くような V1/V2 構造を持っているため、低濃度の KD-247 では変異が現れず、高濃度の KD-247 存在下になって初めて V3-tip に変異が誘導されたのではないかと考えられる。一方 MOKW の Env は V3 エピトープが露出している構造をとっていると考えられ、KD-247 濃度が比較的低い場合、V3 領域に変異を入れなくても逃避できるウイルスが選択されてきたと思われる。ごく少数ではあるが、quasi-species の中に KD-247 抵抗性 V2 変異を持った

ウイルスが存在したため、KD-247 の選択圧により 1 回目の継代から V2 変異をもったウイルスが増殖してきたと考えられる。その後、V2 変異で抵抗できないほどの抗体濃度になった時に、V3 領域に変異を入れることで逃避したと考えられる。同一感染者由来ウイルスの Env の配列を比較した場合、V3 領域の変異は比較的少ないのに対し、V1/V2 領域に変異が蓄積しているのは、比較的低濃度の抗 V3 抗体や CD4bs 抗体、CD4i 抗体などの複数の選択圧に対し、V1/V2 領域の変異によりウイルスが対応していることが一つの原因であることを示唆している。

MOKW は KD-247 非存在下では V2 領域 175P 変異を持ったウイルスが増殖し、抗 V3 抗体だけではなく CD4bs 抗体、CD4i 抗体にも感受性に变化していた。一方、175L を持ったウイルス (MOKW-RDL) は様々な中和抗体や rsCD4 に対して逆に著しく中和抵抗性であった (図 10)。中和抗体の認識エピトープではない V2 領域の 1 アミノ酸変異だけで、中和抵抗性のウイルスが感受性に完全に逆転する現象はこれまで報告されていない。175L というアミノ酸は HIV-1 だけでなく SIVcpz でも保存されているアミノ酸であり、HIV にとって重要なアミノ酸であることが予想される (31)。175L は V2 loop の中心に位置し、この周辺の領域は V3 領域と gp41 非依存的に相互作用があることなどから (3)、in vivo でほとんどの HIV が 175L であるのは、感染に重要な領域 (V3 領域、ケモカインレセプター結合領域、CD4 結合領域など) を変異から守り、gp120 の三量体構造を調節することで、ほとんどの中和抗体から逃避するために必要なアミノ酸であるためなのかもしれない。

MOKW-RDL ウイルスは KD-247 で選択する前、最も多く存在するウイルスであり、single-round の中和実験の結果から KD-247 に対して高度に抵抗性であった (図 6、図 10)。それにも関わらず、KD-247 で選択すると 175L に加え R166K/D167N を持ったウイルスが増殖してきた (図 6)。この R166K/D167N/P175L を持ったウイルス (MOKW-KNL) は MOKW-RDL よりも KD-247 に対して中和感受性であった (図 10)。In vitro で HIV-1 を継代していくと、Env の 165~167 番目のアミノ酸が正電荷のものに置換したウイルスが現れてくるという報告がある (2、13、38、49、57、63)。本研究の MOKW も 166/167 番目のアミノ酸は RD から KN になり、正電荷が増加する変異であった。また、MOKW-RDL は 166/167 番目に変異を持ったウイルスに比べて抗 CD4 抗体に対して 3 倍ほど抵抗性になっていた (図 10)。Pugach らも、in vitro でウイルスを継代すると 165-167 番目に正電荷のアミノ酸変異を持ったウイルスが現れ、抗 CD4 抗体に対して数倍抵抗性になることを示していた (49)。図 13 に示す通り、MOKW-RDL より MOKW-KNL の方が増殖速度が早かったことなどから、175L だけをもったウイルスより KD-247 に対して感受性ではあるが、感染標的細胞上の CD4 分子との相互作用を補うため、166/167 番目に正電荷アミノ酸をもった持ったウイルスが増殖してきたのではないかと考えられる。低濃度 KD-247 存在下では C3 領域に変異を持ったウイルスも現れた。ただし、この変異単独では KD-247 に対して中和抵抗性にはならなかった (図 8)。C3 領域は HIV の感染性を調節する働きがあり (43、60)、C3 変異も低濃度の KD-247 環境における感染性を調節して、抗体から逃避するのに関連していた可能性もある (43、60)。中和抵抗性ウイルスの出現は、細胞への感染性と密接に関連しており、細胞への適合と中和抵抗性のバランスの上で出現すると考えられている (15、21、23、24、45、56、64、66)。本

研究はそのことを *in vitro* の系で示すことができた。

MOKW で見られた V2 領域内の 175 番目のアミノ酸の違い (L が P) による抗 V3 抗体、CD4bs 抗体、CD4i 抗体に対する中和感受性への変化は、中和抵抗性ウイルスである JR-FL でも再現できた (図 14、図 15)。そのメカニズムを詳しく調べたところ、175P 変異の有無に関わらず、単量体 gp120 分子に対し、抗 V3 抗体や一部の CD4bs 抗体の結合活性に違いは見られなかったが、CD4i 抗体である 17b の結合活性は 175P 変異 gp120 に対して有意に上昇していた。(図 16)。このことは、175P 変異により CD4bs 抗体や抗 V3 抗体に対しては三量体の四次構造に影響を与えることで反応性を良くし、CD4i 抗体に対しては単量体 gp120 上で反応性を良くする変化をもたらしていることを示唆している。プロリン (P) というアミノ酸は正確にはイミノ酸に分類され、他のアミノ酸には見られない特徴的な五員環構造を持っている。そのため、タンパク質内での折れ曲がり部位によく見られるアミノ酸である。V3 loop の先端も-GPG-というアミノ酸配列であり、P を境として loop を形成している (20)。175 番目のアミノ酸は V2 領域の中心的な位置にあると考えられることから、175P は V2 構造に大きな影響を与えていると考えられる (31)。これまで X 線結晶解析により gp120 の立体構造が解析されてきたが、V1/V2 領域を含んだ立体構造は決定されていない。V1/V2 領域を含んだままでは結晶化できないことから、この領域は運動性の高い領域であると考えられている (5、19、20、29)。V1 領域の上流および V2 領域の下流領域はケモカインレセプター結合領域である bridging-sheet を形成しており、CD4i 抗体は主にこの領域を標的としている。T 細胞株で継代したウイルスは様々な中和抗体に対し感受性になることが知られており、中和抗体のような選択圧の無い環境では CCR5 や CXCR4 に結合しやすいウイルスの方が早く増殖する。その結果、中和エピトープ (=標的細胞のレセプターと結合領域) を露出するようなウイルスが優位に増殖していると考えられる (5、19、20、21、23、24、29、45、56、64)。175P 変異は V2 構造に変化を引き起こし、その下流にある bridging-sheet の構造に影響与えた結果、単量体 gp120 に対し、CD4i 抗体が結合しやすくなったことが考えられる。

175P 変異を含んだ単量体 gp120 に対し、IgGb12 の結合活性は明らかに落ちていたにも関わらず (図 16)、中和感受性はほとんど変わらなかった (図 15)。IgGb12 は CD4bs 抗体の中で最も広範囲な株を中和でき、conformational masking に影響されない抗体である (28)。他の CD4bs 抗体は主に gp120 の inner domain に結合するのに対し、IgGb12 は CD4 結合の前後でほとんど構造を変えない outer domain に結合する (71)。175P 変異は V2 領域の構造を変え、単量体内の IgGb12 が結合するエピトープを遮蔽している可能性がある。しかし三量体になった場合、隣接した gp120 分子同士の立体構造の影響で IgGb12 結合領域が開いた構造をとり、結果として 175 番目のアミノ酸による中和感受性に変化がなくなっているのかもしれない。今後、このメカニズムの詳細な解析が必要である。

175P と 175L を両方含んだヘテロ三量体 Env をもった pseudotype virus の中和実験から、175P を含んだ Env は三量体内の隣接した gp120 分子の構造を変え、エピトープを露出させることがわかった (図 18)。このことは、HIV の三量体構造そのものが中和抗体から逃れるのに重要であることを示唆している。本研究では V2 領域の変異による中和感受性の変化のメカニズムを示し

たが、V1、C3、C4、V5 領域や gp41 の変異により、中和感受性が変化することも報告されている (2, 44, 60)。いずれもエピトープ以外の領域の変異であることから、これらも V2 領域同様、三量体構造を変化させることで中和感受性を調節していることが予想される。今後、Env の三量体構造の解析を詳細に行うことで、中和抵抗性のメカニズムをより深く解明できるといえる。

8. 結語

本研究により、HIVは抗V3抗体からの逃避にはエピトープ以外の領域であるV2領域の変異が重要であることを示した。また、V2領域の変異では対応できないほどの抗体濃度になった時のみ、本来の中和エピトープであるV3領域に変異が入り、中和抗体から逃れることが分かった。一方、V2領域の1アミノ酸変異(L175P)で抗V3抗体だけでなくCD4i抗体、CD4bs抗体、rsCD4にまで中和感受性になることは驚きであった。ヘテロ三量体を形成したEnvをもったpseudotype virusによる中和実験の結果から、V2領域の変異により三量体内の隣接したgp120、つまりEnvの四次構造を変化させ、エピトープを露出させることがわかった。このことは、三量体構造そのものが中和抗体から逃れるのに非常に重要な要素であることを示している。

近年、顕微鏡技術やコンピューター技術の進歩により、ナノスケールの分子も観察できるようになってきた。今後X線結晶解析や超低温電子顕微鏡などを複合的に活用し、ウイルス膜表面上での真の三量体構造を解析することが中和抵抗性を理解する上で重要であろう。これらの解析により、三量体構造に影響されにくい中和エピトープがみつき、強力な中和抗体を誘導することが可能となる。また、175P変異を持った三量体Envはほとんどの種類の中和エピトープがアクセス可能な状態になることから、175P変異を含んだ三量体Envをワクチンとして免疫することにより、広範囲の株を中和出来るような抗体のセットを誘導できるかもしれない。

9. 参考文献

1. **Binley J. M., T. Wrin, B. Korber, M. B. Zwick, M. B. Zwick, M. Wang, C. Chappey, G. Stiegler, R. Kunert, S. Zolla-Pazner, H. Katinger, C. J. Petropoulos, and D. R. Burton.** 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* **78**:13232-13252.
2. **Bouma, P., M. Leavitt, P. F. Zhang, I. A. Sidorov, D. S. Dimitrov, and G. V. Quinnan, Jr.** 2003. Multiple interactions across the surface of the gp120 core structure determine the global neutralization resistance phenotype of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **77**:8061-8071.
3. **Center, R. J., P. L. Earl, J. Lebowitz, P. Schuck, and B. Moss.** 2000. The human immunodeficiency virus type 1 gp120 V2 domain mediates gp41-independent intersubunit contacts. *J. Virol.* **74**:4448-4455.
4. **Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, and B. Moss.** 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J. Virol.* **76**:7863-7867.
5. **Chen B., E. M. Vogan, H. Gong, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and S. C. Harrison.** 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature.* **433**:834-841.
6. **Cole, K. S., J. D. Steckbeck, J. L. Rowles, R. C. Desrosiers, and R. C. Montelaro.** 2004. Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3. *J. Virol.* **78**:1525-1539.
7. **Conley A. J., J. A. Kessler II, L. J. Boots, P. M. McKenna, W. A. Schleif, E. A. Emini, G. E. Mark III, H. Katinger, E. K. Cobb, S. M. Lunceford, S. R. Rouse, and K. K. Murthy.** 1996. The consequence of passive administration of an anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary virus isolate. *J. Virol.* **70**: 6751-6758.
8. **Decker J. M., F. Bibollet-Ruche, X. Wei, S. Wang, D. N. Levy, W. Wang, E. Delaporte, M. Peeters, C. A. Derdeyn, S. Allen, E. Hunter, M. S. Saag, J. A. Hoxie, B. H. Hahn, P. D. Kwong, J. E. Robinson, and G. M. Shaw.** 2005. Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J. Exp. Med.* **201**:1407-1419.
9. **D'Costa, S., K. S. Slobod, R. G. Webster, S. W. White, and J. L. Hurwitz.** 2001. Structural features of HIV envelope defined by antibody escape mutant analysis. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **17**:1205-1209.
10. **Eda, Y., T. Murakami, Y. Ami, T. Nakasone, M. Takizawa, K. Someya, M. Kaizu, Y. Izumi, N. Yoshino, S. Matsushita, H. Higuchi, H. Matsui, K. Shinohara, H. Takeuchi, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, and M. Honda.** 2006. Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively

- suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **80**:5563-5570.
11. **Eda, Y., M. Takizawa, T. Murakami, H. Maeda, K. Kimachi, H. Yonemura, S. Koyanagi, K. Shiosaki, H. Higuchi, K. Makizumi, T. Nakashima, K. Osatomi, S. Tokiyoshi, S. Matsushita, N. Yamamoto, and M. Honda.** 2006. Sequential immunization with V3 peptides from primary human immunodeficiency virus type 1 produces cross-neutralizing antibodies against primary isolates with a matching narrow-neutralization sequence motif. *J. Virol.* **80**:5552-5562.
 12. **Etemad-Moghadam, B., Y. Sun, E. K. Nicholson, G. B. Karlsson, D. Schenten, and J. Sodroski.** 1999. Determinants of neutralization resistance in the envelope glycoproteins of a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J. Virol.* **73**:8873-8879.
 13. **Follis, K. E., M. Trahey, R. A. LaCasse, and J. H. Nunberg.** 1998. Continued utilization of CCR5 coreceptor by a newly derived T-cell line-adapted isolate of human immunodeficiency
 14. **Groenink, M., R. A. Fouchier, S. Broersen, C. H. Baker, M. Koot, A. B. van't Wout, H. G. Huisman, F. Miedema, M. Tersmette, and H. Schuitemaker.** 1993. Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* **260**:1513-1516.
 15. **Harrowe, G., and C. Cheng-Mayer.** 1995. Amino acid substitutions in the V3 loop are responsible for adaptation to growth in transformed T-cell lines of a primary human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **210**:490-494.
 16. **Herrera C., P. J. Klasse, C. W. Kibler, E. Michael, J. P. Moore, S. Beddows.** 2006. Dominant-negative effect of hetero-oligomerization on the function of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex. *Virology* **351**:121-132.
 17. **Hope, T. J., X. J. Huang, D. McDonald, and T. G. Parslow.** 1990. Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine-rich motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7787-7791.
 18. **Hu, Q., J. O. Trent, G. D. Tomaras, Z. Wang, J. L. Murray, S. M. Conolly, J. M. Navenot, A. P. Barry, M. L. Greenberg, and S. C. Peiper.** 2000. Identification of ENV determinants in V3 that influence the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Mol. Biol.* **302**:359-375.
 19. **Huang C., S. N. Lam, P. Accharya, M. Tang, S. Xiang, S. S. Hussan, R. L. Stanfield, J. Roginson, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, C. A. Bewley, P. D. Kwong.** 2007. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **317**:1930-1934.
 20. **Huang, C., M. Tang, M. Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R. L. Stanfield, D. S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, and P. D. Kwong.** 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**:1025-1028.
 21. **Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1991. Identification of the envelope

- V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-74.
22. **Kang, S. M., F. S. Quan, C. Huang, L. Guo, L. Ye, C. Yang, and R. W. Compans.** 2005. Modified HIV envelope proteins with enhanced binding to neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* **331**:20-32.
 23. **Koito, A., G. Harrowe, J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1994. Functional role of the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 in infection of primary macrophages and soluble CD4 neutralization. *J. Virol.* **68**:2253-2259.
 24. **Koito, A., L. Stamatatos, and C. Cheng-Mayer.** 1995. Small amino acid sequence changes within the V2 domain can affect the function of a T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120. *Virology* **206**:878-884.
 25. **Krachmarov, C., A. Pinter, W. J. Honnen, M. K. Gorny, P. N. Nyambi, S. Zolla-Pazner, and S. C. Kayman.** 2005. Antibodies that are cross-reactive for human immunodeficiency virus type 1 clade a and clade B V3 domains are common in patient sera from Cameroon, but their neutralization activity is usually restricted by epitope masking. *J. Virol.* **79**:780-790.
 26. **Krachmarov, C. P., W. J. Honnen, S. C. Kayman, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and A. Pinter.** 2006. Factors determining the breadth and potency of neutralization by V3-specific human monoclonal antibodies derived from subjects infected with clade a or clade B strains of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **80**:7127-7135.
 27. **Kuhmann, S. E., P. Pugach, K. J. Kunstman, J. Taylor, R. L. Stanfield, A. Snyder, J. M. Strizki, J. Riley, B. M. Baroudy, I. A. Wilson, B. T. Korber, S. M. Wolinsky, and J. P. Moore.** 2004. Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J. Virol.* **78**:2790-2807.
 28. **Kwong, P. D., M. L. Doyle, D. J. Casper, C. Cicala, S. A. Leavitt, S. Majeed, T. D. Steenbeke, M. Venturi, I. Chaiken, M. Fung, H. Katinger, P. W. Parren, J. Robinson, D. Van Ryk, L. Wang, D. R. Burton, E. Freire, R. Wyatt, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, and J. Arthos.** 2002. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**:678-682.
 29. **Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
 30. **Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 2000. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **74**:1961-1972.
 31. **Leitner, T., B. Foley, B. Hahn, P. Marx, F. McCutchan, J. Mellors, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2005. HIV Sequence Compendium 2005. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, LA-UR number 06-0680.

32. **Li M., F. Gao, J. R. Mascola, L. Stamatatos, V. R. Polonis, M. Koutsoukos, G. Voss, P. Goepfert, P. Gilbert, K. M. Greene, M. Biliska, D. L. Kothe, J. F. Salazar-Gonzalez, X. Wei, J. M. Decker, B. H. Hahn, and D. C. Montefiori.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* **79**:10108-10125.
33. **Maeda, K., K. Yoshimura, S. Shibayama, H. Habashita, H. Tada, K. Sagawa, T. Miyakawa, M. Aoki, D. Fukushima, and H. Mitsuya.** 2001. Novel low molecular weight spirodiketopiperazine derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection through their antagonistic effects on CCR5. *J. Biol. Chem.* **276**:35194-35200.
34. **Masuda, T., S. Matsushita, M. J. Kuroda, M. Kannagi, K. Takatsuki, and S. Harada.** 1990. Generation of neutralization-resistant HIV-1 in vitro due to amino acid interchanges of third hypervariable env region. *J. Immunol.* **145**:3240-3246.
35. **Matsushita S., M. Robert-Guroff, J. Rusche, A. Koito, T. Hattori, H. Hoshino, K. Javaherian, K. Takatsuki and S. Putney.** 1988. Characterization of a human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. *J. Virol.* **62**:2107-2114.
36. **Matsushita S, S. Takahama, J. Shibata, T. Kimura, K. Shiozaki, Y. Eda, A. Koito, T. Murakami, and K. Yoshimura.** 2005. Ex vivo neutralization of HIV-1 quasi-species by a broadly reactive humanized monoclonal antibody KD-247. *Hum. Antibodies* **14**:81-88.
37. **McCaffrey, R. A., C. Saunders, M. Hensel, and L. Stamatatos.** 2004. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J. Virol.* **78**:3279-3295.
38. **Mo, H., L. Stamatatos, J. E. Ip, C. F. Barbas, P. W. Parren, D. R. Burton, J. P. Moore, and D. D. Ho.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 mutants that escape neutralization by human monoclonal antibody IgG1b12. *J. Virol.* **71**:6869-6874.
39. **Moore, J. P., Y. Cao, D. D. Ho, and R. A. Koup.** 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:5142-5155.
40. **Moore, J. P., Y. Cao, L. Qing, Q. J. Sattentau, J. Pyati, R. Koduri, J. Robinson, C. F. Barbas, 3rd, D. R. Burton, and D. D. Ho.** 1995. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J. Virol.* **69**:101-109.
41. **Moore, J. P., and D. D. Ho.** 1993. Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans. *J. Virol.* **67**:863-875.

42. **Morikita, T., Y. Maeda, S. Fujii, S. Matsushita, K. Obaru, and K. Takatsuki.** 1997. The V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 modulates the sensitivity to neutralization by soluble CD4 and cellular tropism. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **13**:1291-1299.
43. **Otto, C., B. A. Puffer, S. Pohlmann, R. W. Doms, and F. Kirchhoff.** 2003. Mutations in the C3 region of human and simian immunodeficiency virus envelope have differential effects on viral infectivity, replication, and CD4-dependency. *Virology* **315**:292-302.
44. **Park, E. J., L. K. Vujcic, R. Anand, T. S. Theodore, and G. V. Quinnan, Jr.** 1998. Mutations in both gp120 and gp41 are responsible for the broad neutralization resistance of variant human immunodeficiency virus type 1 MN to antibodies directed at V3 and non-V3 epitopes. *J. Virol.* **72**:7099-7107.
45. **Pastore, C., R. Nedellec, A. Ramos, S. Pontow, L. Ratner, and D. E. Mosier.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J. Virol.* **80**:750-758.
46. **Pilgrim, A. K., G. Pantaleo, O. J. Cohen, L. M. Fink, J. Y. Zhou, J. T. Zhou, D. P. Bolognesi, A. S. Fauci, and D. C. Montefiori.** 1997. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* **176**:924-932.
47. **Pinter, A., W. J. Honnen, P. D'Agostino, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and S. C. Kayman.** 2005. The C108g epitope in the V2 domain of gp120 functions as a potent neutralization target when introduced into envelope proteins derived from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J. Virol.* **79**:6909-6917.
48. **Pinter, A., W. J. Honnen, Y. He, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and S. C. Kayman.** 2004. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J. Virol.* **78**:5205-5215.
49. **Pugach, P., S. E. Kuhmann, J. Taylor, A. J. Marozsan, A. Snyder, T. Ketas, S. M. Wolinsky, B. T. Korber, and J. P. Moore.** 2004. The prolonged culture of human immunodeficiency virus type 1 in primary lymphocytes increases its sensitivity to neutralization by soluble CD4. *Virology* **321**:8-22.
50. **Sager M., X. Wu, S. Lee, and J. Overbaugh.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* **80**:9586-9598.
51. **Salzwedel K., and E. A. Berger.** 2000. Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: Functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12794-12799.
52. **Saunders, C. J., R. A. McCaffrey, I. Zharkikh, Z. Kraft, S. E. Malenbaum, B. Burke, C.**

- Cheng-Mayer, and L. Stamatatos.** 2005. The V1, V2, and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope differentially affect the viral phenotype in an isolate-dependent manner. *J. Virol.* **79**:9069-9080.
53. **Sawyer, L. S., M. T. Wrin, L. Crawford-Miksza, B. Potts, Y. Wu, P. A. Weber, R. D. Alfonso, and C. V. Hanson.** 1994. Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 is determined in part by the cell in which the virus is propagated. *J. Virol.* **68**:1342-1349.
54. **Shibata J., K. Yoshimura, A. Honda, A. Koito, T. Murakami, and S. Matsushita.** 2007. Impact of V2 mutations on escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J. Virol.* **81**:3757-3768.
55. **Schon A, N. Madani, J. C. Klein, A. Hubicki, D. Ng, X. Yang, A. B. Smith 3rd, J. Sodroski, E. Freire.** 2006. Thermodynamics of binding of a low-molecular-weight CD4 mimetic to HIV-1 gp120. *Biochemistry.* **45**:10973-10980.
56. **Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9434-9438.
57. **Sullivan, N., M. Thali, C. Furman, D. D. Ho, and J. Sodroski.** 1993. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. *J. Virol.* **67**:3674-3679.
58. **Trkola, A., H. Kuster, P. Rusert, B. Joos, M. Fischer, C. Leemann, A. Manrique, M. Huber, M. Rehr, A. Oxenius, R. Weber, G. Stiegler, B. Vcelar, H. Katinger, L. Aceto, and H. F. Gunthard.** 2005. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **11**:615-622.
59. **Trkola, A., A. B. Pomales, H. Yuan, B. Korber, P. J. Maddon, G. P. Allaway, H. Katinger, C. F. Barbas, 3rd, D. R. Burton, D. D. Ho, and et al.** 1995. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* **69**:6609-6617.
60. **Wang, F. X., T. Kimura, K. Nishihara, K. Yoshimura, A. Koito, and S. Matsushita.** 2002. Emergence of autologous neutralization-resistant variants from preexisting human immunodeficiency virus (HIV) quasi species during virus rebound in HIV type 1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **185**:608-617.
61. **Wang, N., T. Zhu, and D. D. Ho.** 1995. Sequence diversity of V1 and V2 domains of gp120 from human immunodeficiency virus type 1: lack of correlation with viral phenotype. *J. Virol.* **69**:2708-2715.
62. **Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G.**

- Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.
63. **Wrin, T., T. P. Loh, J. C. Vennari, H. Schuitemaker, and J. H. Nunberg.** 1995. Adaptation to persistent growth in the H9 cell line renders a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 sensitive to neutralization by vaccine sera. *J. Virol.* **69**:39-48.
64. **Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardin, J. Robinson, and J. Sodroski.** 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* **69**:5723-5733.
65. **Yoshida, K., M. Nakamura, and T. Ohno.** 1997. Mutations of the HIV type 1 V3 loop under selection pressure with neutralizing monoclonal antibody NM-01. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **13**:1283-1290.
66. **Yoshimura, K., S. Matsushita, A. Hayashi, and K. Takatsuki.** 1996. Relationship of HIV-1 envelope V2 and V3 sequences of the primary isolates to the viral phenotype. *Microbiol. Immunol.* **40**:277-287.
67. **Yoshimura, K., J. Shibata, T. Kimura, A. Honda, Y. Maeda, A. Koito, T. Murakami, H. Mitsuya, and S. Matsushita.** 2006. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro. *AIDS* **20**:2065-2073.
68. **Yusa, K., Y. Maeda, A. Fujioka, K. Monde, and S. Harada.** 2005. Isolation of TAK-779-resistant HIV-1 from an R5 HIV-1 GP120 V3 loop library. *J. Biol. Chem.* **280**:30083-30090.
69. **Zhang, P. F., P. Bouma, E. J. Park, J. B. Margolick, J. E. Robinson, S. Zolla-Pazner, M. N. Flora, and G. V. Quinnan, Jr.** 2002. A variable region 3 (V3) mutation determines a global neutralization phenotype and CD4-independent infectivity of a human immunodeficiency virus type 1 envelope associated with a broadly cross-reactive, primate virus-neutralizing antibody response. *J. Virol.* **76**:644-655.
70. **Zhao Q., L. Ma, S. Jiang, H. Lu, S. Liu, Y. He, N. Strick, N. Neamati, A. K. Debnath.** 2005. Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology* **339**:213-225.
71. **Zhou T., L. Xu, B. Dey, A. J. Hessel, D. V. Ryk, S. Xiong, X. Yang, M. Zhang, M. B. Zwick, J. Arthos, D. R. Burton, D. S. Dimitrov, J. Sodroski, R. Wyatt, G. J. Nabel, and P. D. Kwong.** 2007. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* **445**:732-737.
72. **Zolla-Pazner, S.** 2004. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:199-210.

10. 図表およびその説明

図 1

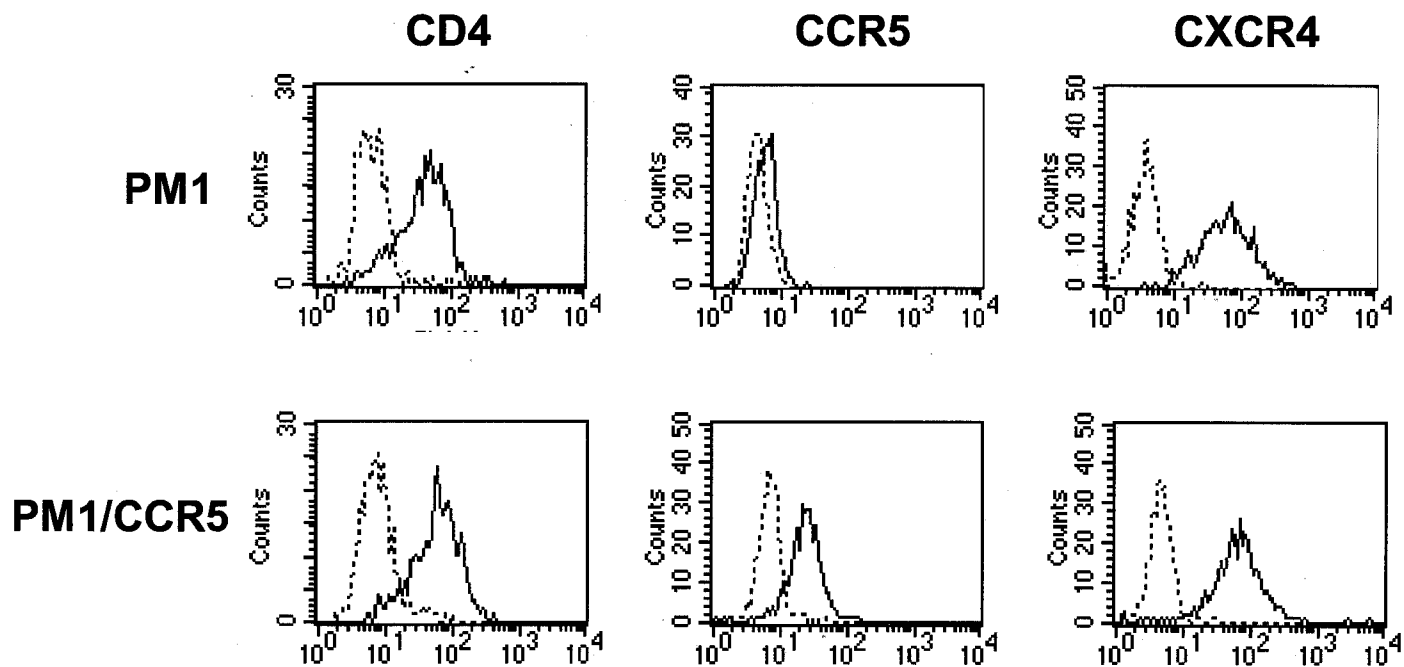


図1 PM1およびPM1/CCR5細胞表面上のCD4、CCR5、CXCR4の発現量の比較

PM1およびPM1/CCR5細胞上のレセプターCD4、CCR5、CXCR4の発現をフローサイトメーターで確認した。点線はネガティブコントロールの抗CD19抗体の結合活性である。

表1 KD-247抵抗性JR-FLに対する単クローン抗体、阻害薬の抗HIV効果

Antibody or inhibitor		IC ₅₀ ± S.D.s ^a		Fold change	P value ^b
		JR-FL(-)8P	JR-FL(1000)8P		
KD-247	(μg/ml)	6.3 ± 5.0	>100	>16	<0.01
TAK-779	(nM)	217 ± 50.3	54.7 ± 29.5	0.3	<0.01
SCH-C	(nM)	27.5 ± 3.5	8.0 ± 1.4	0.3	0.02
AK-602	(nM)	7.1 ± 4.5	0.15 ± 0.08	0.02	0.02
ddI ^c	(μM)	1.0 ± 0.57	1.0 ± 0.27	1.0	0.98
3TC	(μM)	0.33 ± 0.01	0.29 ± 0.04	0.9	0.30
NFV	(μM)	0.033 ± 0.001	0.036 ± 0.006	1.1	0.56
IDV	(μM)	0.017 ± 0.004	0.016 ± 0.005	0.9	0.85
APV	(μM)	0.022 ± 0.001	0.017 ± 0.008	0.8	0.47
SQV	(μM)	0.0038 ± 0.0004	0.0034 ± 0.0004	0.9	0.42
rsCD4	(μg/ml)	3.3 ± 0.07	0.57 ± 0.48	0.2	0.02
Anti-CD4 mAb (RPA-T4)	(μg/ml)	0.01 ± 0.004	0.03 ± 0.004	3.0	0.01
Anti-CCR5 mAb (2D7)	(μg/ml)	0.19 ± 0.03	0.066 ± 0.005	0.3	0.03
MIP-1α	(μg/ml)	0.006 ± 0.002	0.0029 ± 0.001	0.5	0.11
MIP-1β	(μg/ml)	0.39 ± 0.08	0.23 ± 0.18	0.6	0.22
RANTES	(μg/ml)	0.045 ± 0.0007	0.005 ± 0.001	0.1	0.02

^a 様々な濃度の単クローン抗体や阻害薬存在下で2×10³のPM1/CCR5細胞に100TCID₅₀のJR-FL(-)8PまたはJR-FL(1000)8Pを感染させた。感染後7日目の細胞でMTT assayを行い、IC₅₀の値を決定した。結果は独立した2-3回の実験を平均した値であり、±以下の値は標準偏差 (standard deviation; SD) を示す。

^b t検定を行い、P < 0.05となったものを有意と見なした (太字)。

^c 略語 : ddl, didanosine; 3TC, lamivudine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir; APV, amprenavir; SQV, saquinavir

図 2

JR-FL	-CTRPNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC-
In vitro selection with KD-247	
P1 (1) - DS
P2 (5) - DS
P3 (10) - 9/12
P3 (10)S..... - 1/12
P3 (10)G..... - 1/12
P3 (10)D..... - 1/12
P4 (50) - 12/12
P5 (300) - 11/14
P5 (300)Y..... - 1/14
P5 (300)R..... - 1/14
P5 (300)T..... - 1/14
P6 (600) - 11/13
P6 (600)E..... - 2/13
P7 (600)E..... - 9/12
P7 (600)E.....T..... - 1/12
P7 (600) - 2/12
P8 (1000)E..... - 11/16
P8 (1000)A.....E..... - 1/16
P8 (1000) - 4/16
No antibody control	
P4 (-) - 12/12
P8 (-) - 15/16
P8 (-)R..... - 1/16

図2 KD-247存在/非存在下で継代したJR-FL感染PM1/CCR5細胞上清ウイルスのgp120-V3領域のアミノ酸配列

KD-247存在/非存在下でJR-FLをPM1/CCR5に感染させて継代した。培養上清中のウイルスRNAを回収し、逆転写によりcDNAを合成した。そのcDNAを鋳型とし、env領域をPCRにより増幅してクローニングし、シークエンスによりアミノ酸配列を決定した。図はV3領域のアミノ酸配列を示している。一番上の段のアミノ酸配列は野生株(wt)のJR-FL配列である。右側の数字はシークエンスして現れたクローンの数を示している。ドットはwtのアミノ酸と同じアミノ酸であることを示している。

DS; direct sequence

図 3

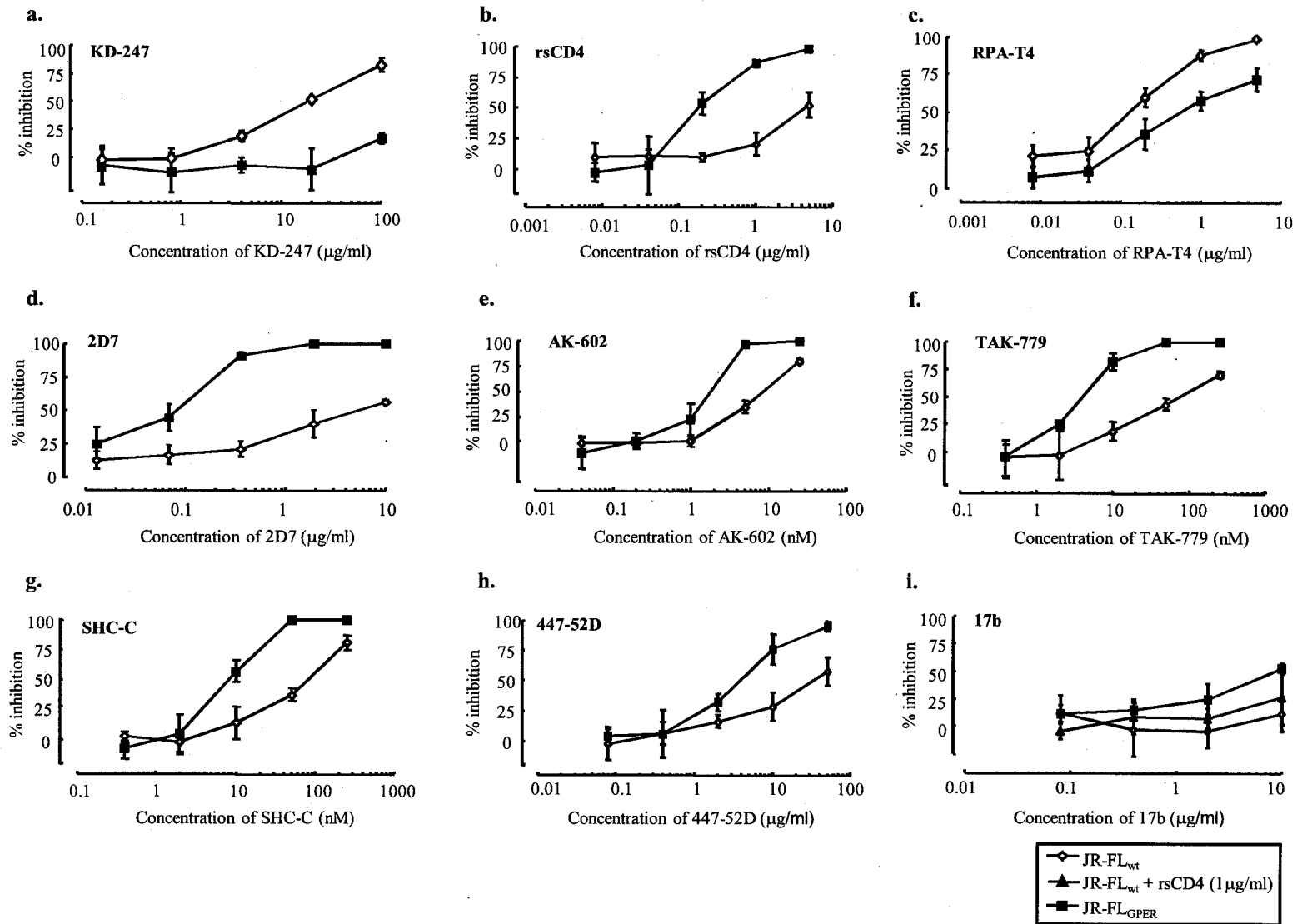
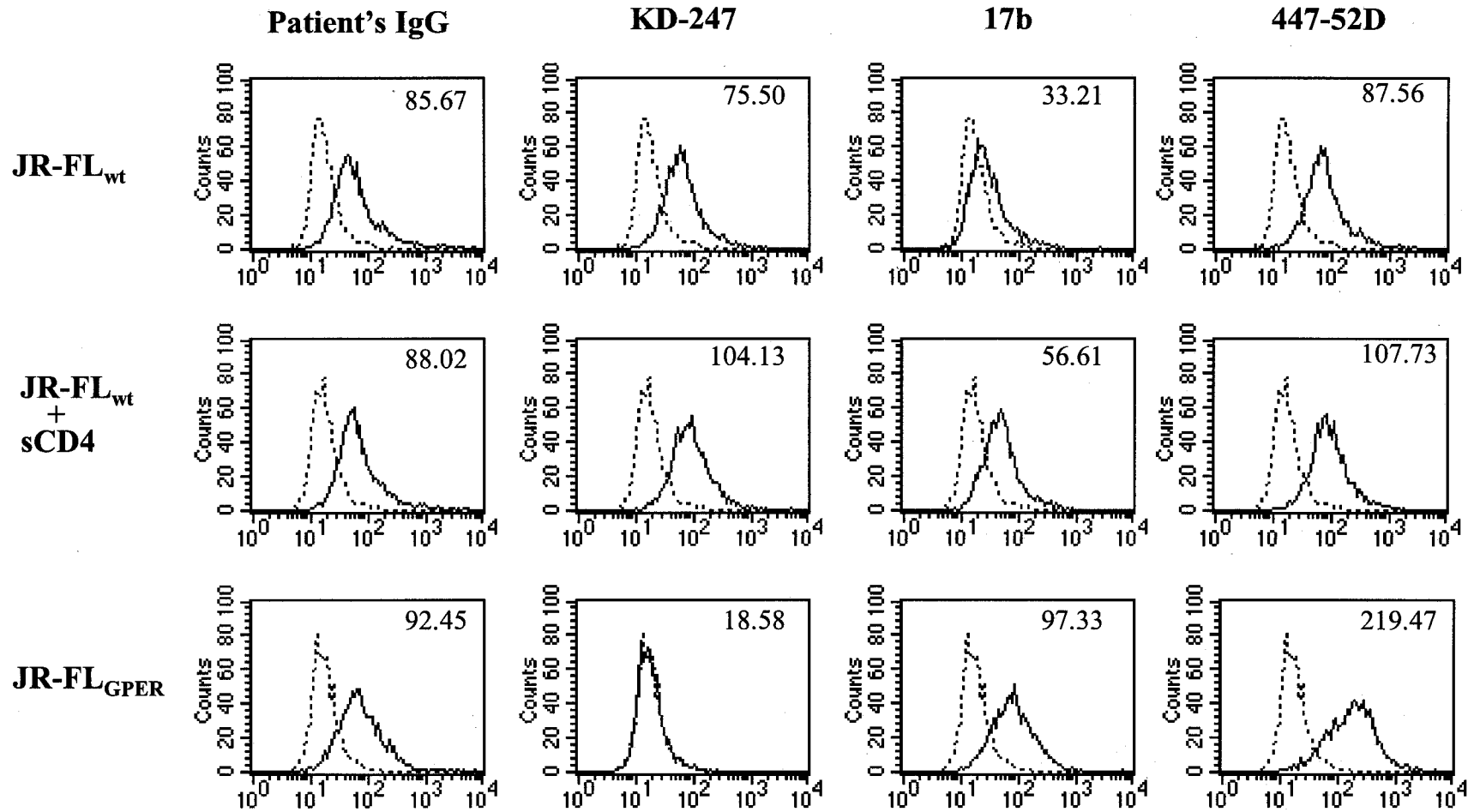


図3 JR-FL_{wt}およびJR-FL_{GPER}をもったレポーター-pseudotype virusの中和抗体、rsCD4、CCR5阻害薬に対する中和感受性

KD-247(a)、rsCD4(b)、447-52D(h)、1μg/mlのrsCD4存在/非存在下の17b(i)、はJR-FL_{wt}またはJR-FL_{GPER}と15分インキュベートした後、GHOST-hi5細胞へ感染させた。RPA-T4(c)、2D7(d)、AK-602(e)、TAK-779(f)、SCH-C (g) は予めGHOST-hi5細胞に加えて15分間インキュベートし、続いてpsuedotype virusを加えた。感染後2日後ルシフェラーゼ活性を測定して阻害効果を調べた。

図4



43

図4 JR-FL_{wt}およびJR-FL_{GPER} Envを発現した細胞表面への単クローン抗体結合活性の比較

293T細胞へJR-FL_{wt}またはJR-FL_{GPER} Env発現ベクターをtransfectionし、36時間後、細胞を回収して単クローン抗体で染色した。Env発現ベクターにはInternal ribosome entry site (IRES)配列とその下流にGFP遺伝子が挿入されている。GFP陽性細胞にゲートをかけてEnv発現細胞への抗体結合活性を測定した。一番上の列はJR-FL_{wt} Env発現細胞、真ん中の列は0.5μg/mlのrsCD4存在下でのJR-FL_{wt} Env発現細胞、一番下の列はJR-FL_{GPER} Env発現細胞への抗体結合活性を示している。ネガティブコントロールとして抗ヒトCD19抗体を使用した(点線)。結果は2回実験を行ったうちの1回の結果である。各グラフの右上に書かれている数字はMean Fluorescence Intensity (MFI)を示している。

図5

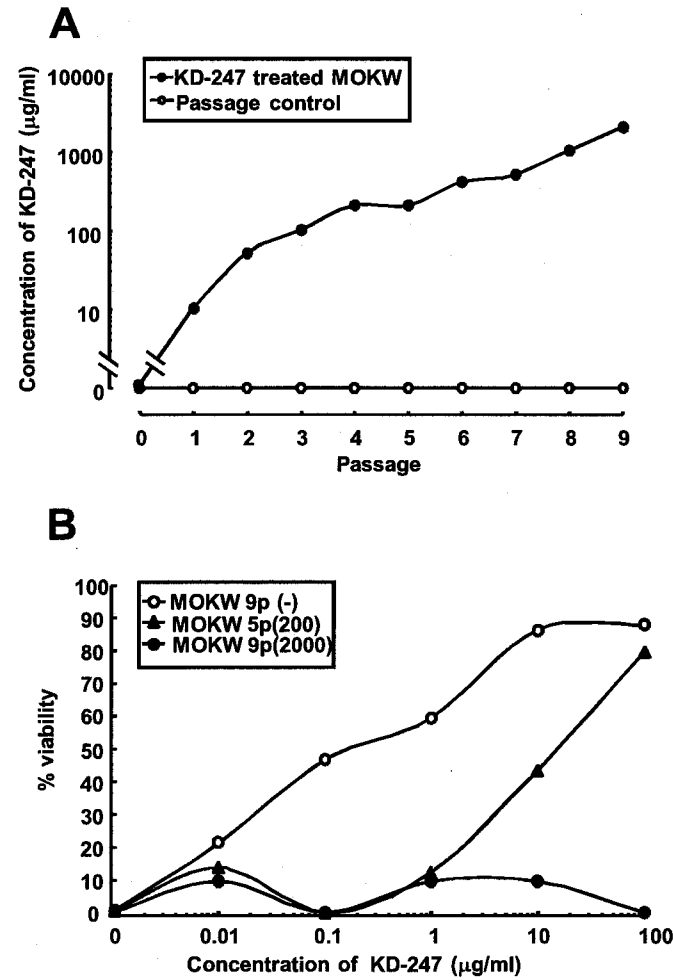


図5 KD-247抵抗性ウイルスの選択

(A)PM1/CCR5細胞へMOKWを感染させ、KD-247抵抗性ウイルスを誘導させた。継代時のKD-247濃度(μg/ml)を表している。(B) KD-247存在下で選択されてきたMOKW5p(200)、MOKW9p(2000)のKD-247に対する中和感受性をMTT assayにより測定した。PM1/CCR5細胞(2x10³)に100TCID₅₀に相当するMOKWを感染させ、様々な濃度のKD-247存在下で7日間培養した。実験はduplicateで行った。結果は3回行ったうちの1回を示している。

図6

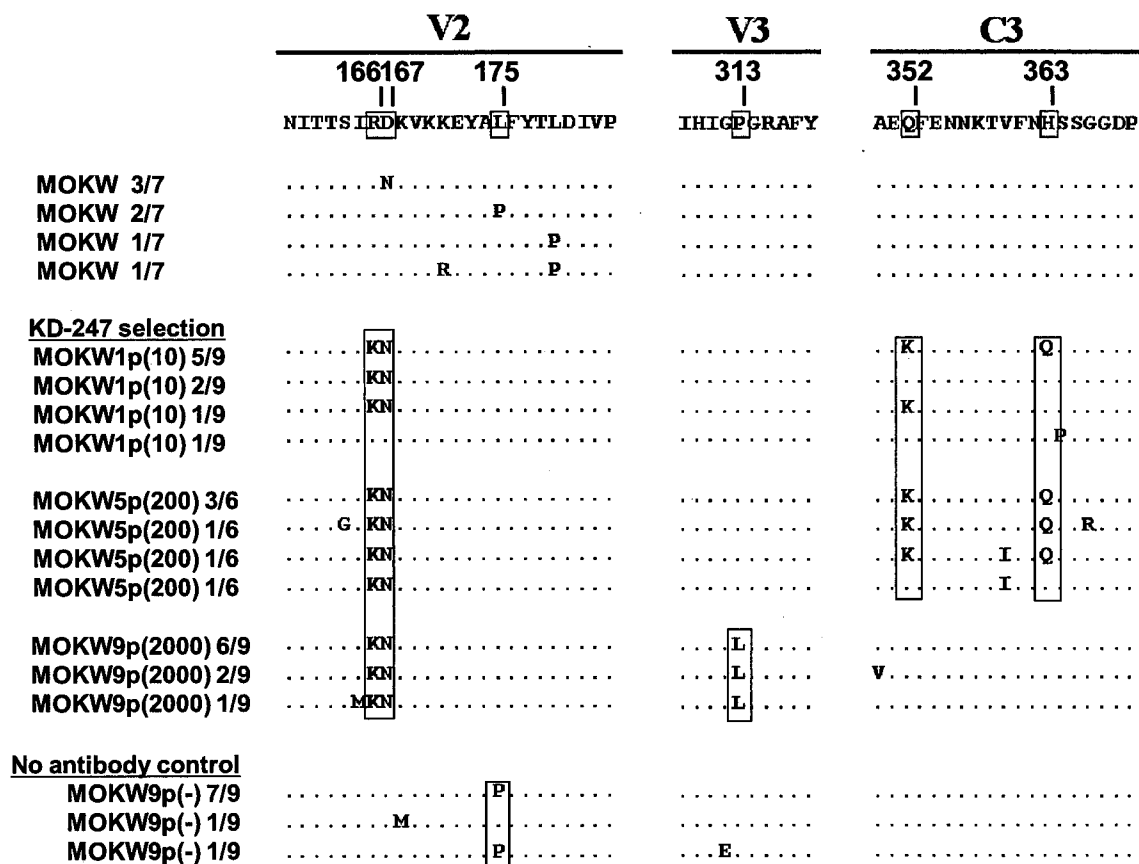


図6 KD-247存在/非存在下で継代したMOKW感染PM1/CCR5細胞上清ウイルスのgp120のアミノ酸配列

培養上清中のウイルスRNAを回収し、逆転写によりcDNAを合成した。そのcDNAを鋳型としてenv領域をPCRにより増幅してクローニングし、シーケンスによりアミノ酸配列を決定した。図はV2、V3、C3領域の一部のアミノ酸配列を示している。一番上の段はKD-247選択前の主要ウイルスのアミノ酸配列を示している。アミノ酸配列の番号はHXB2を基にしている。各クローン名の右側の数字はシーケンスして現れたクローンの数を示している。ドットは一番上段に示したアミノ酸と同じアミノ酸であることを示している。

図7

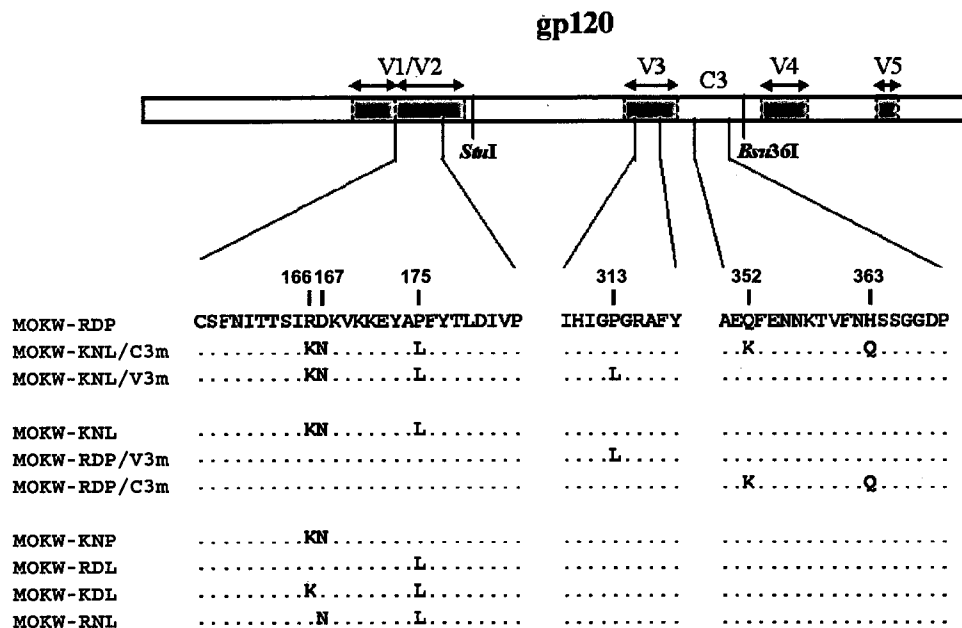


図7 MOKW Env発見ベクターのアミノ酸配列

MOKW-RDP、MOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL/V3m env遺伝子はKD-247非存在下/存在下で継代したMOKW感染PM1/CCR5細胞のDNAよりPCRにて増幅させて作製した。MOKW-KNL、MOKW-RDP/V3m、MOKW-RDP/C3m Env発見ベクターは、MOKW-RDPとMOKW-KNL/C3m、MOKW-KNL/V3m Env発見ベクターのStuI-Bsu36I断片を組み換えることで作製した。MOKW-KNP、MOKW-RDL、MOKW-KDL、MOKW-RNL Env発見ベクターはsite-directed mutagenesis法を用いて作製した。番号はHXB2の配列に対応しており、ドットはMOKW-RDPと同じアミノ酸配列であることを表している。

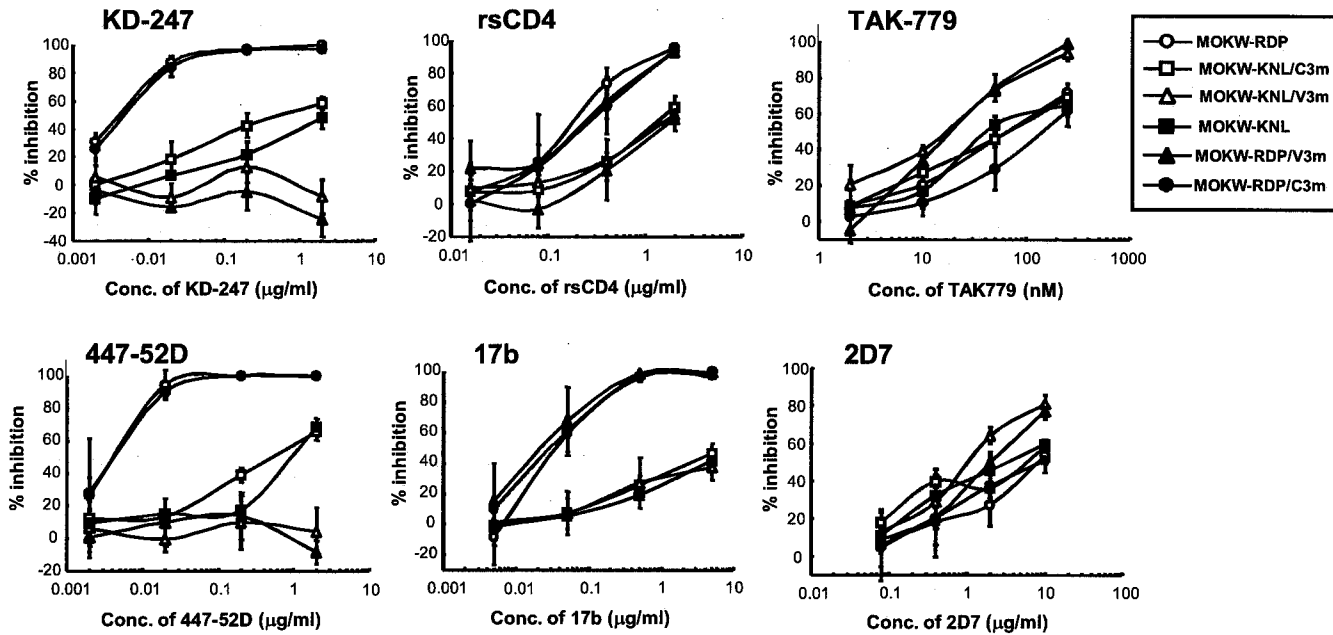


図8 単クローン抗体、rsCD4、CCR5阻害薬に対するMOKW pseudotype virusの中和感受性の比較

KD-247、447-52D、rsCD4、17bを100TCID₅₀のMOKW pseudotype virusと15分間インキュベートし、標的細胞のGHOST-hi5細胞へ加えた。TAK-779と2D7はGHOST-hi5へ加えたあと15分間インキュベートし、その後MOKW pseudotype virusを加えた。2日後ルシフェラーゼ活性を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

表2 MOKW pseudotype virusに対する単クローン抗体、阻害薬の抗HIV効果

Class	Compound	IC ₅₀ (μg/ml) of the indicated virus (relative IC ₅₀) ^a					
		MOKW-RDP	MOKW-KNL/ C3m	MOKW-KNL/ V3m	MOKW-RDP/ C3m	MOKW-KNL	MOKW-RDP/ V3m
V3 MAbs	KD-247	0.004 (1)	0.5 (125)	>100 (>25,000)	0.005 (1.3)	2 (500)	>100 (>25,000)
	447-52D	0.004 (1)	0.5 (125)	>2 (>500)	0.004 (1)	0.8 (200)	>2 (>500)
CD4-induced MAb	17b	0.035 (1)	>5 (>143)	>5 (>143)	0.03 (0.86)	>5 (>143)	0.02 (0.57)
CD4	rsCD4	0.18 (1)	1.3 (7.22)	1.5 (8.33)	0.24 (1.33)	1.8 (10)	0.24 (1.33)
CCR5 MAb	2D7	8 (1)	6.8 (0.85)	1 (0.13)	8 (1)	3.2 (0.4)	2 (0.25)
CCR5 inhibitor	TAK-779	63 (1)	63 (1)	18 (0.29)	140 (2.22)	65 (1)	18 (0.29)
CD4 MAb	RPA-T4	0.4 (1)	0.26 (0.65)	0.22 (0.55)	0.5 (1.25)	0.22 (0.55)	0.44 (1.1)

^a 様々な濃度の単クローン抗体や阻害薬存在下で 2×10^4 のGHOST-hi5細胞に100TCID₅₀のMOKW pseudotype virusをを感染させた。感染後2日目の細胞のluciferase活性を測定することによりIC₅₀の値を決定した。括弧内の値はMOKW-RDPのIC₅₀を1とした時の値である。TAK-779のみnM濃度である。すべての実験はtriplicateで行い、2-3回実験を行ったうちの一回の結果を示している。

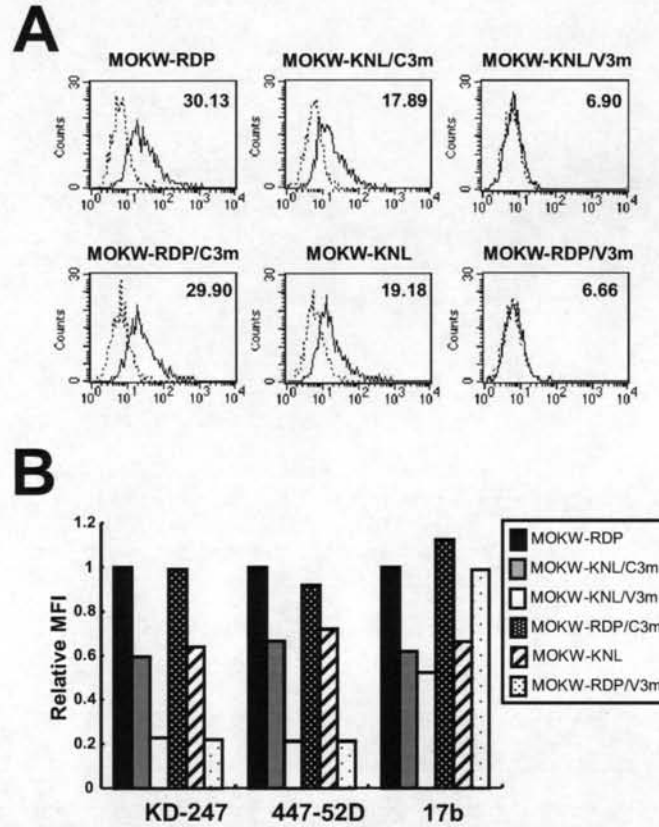
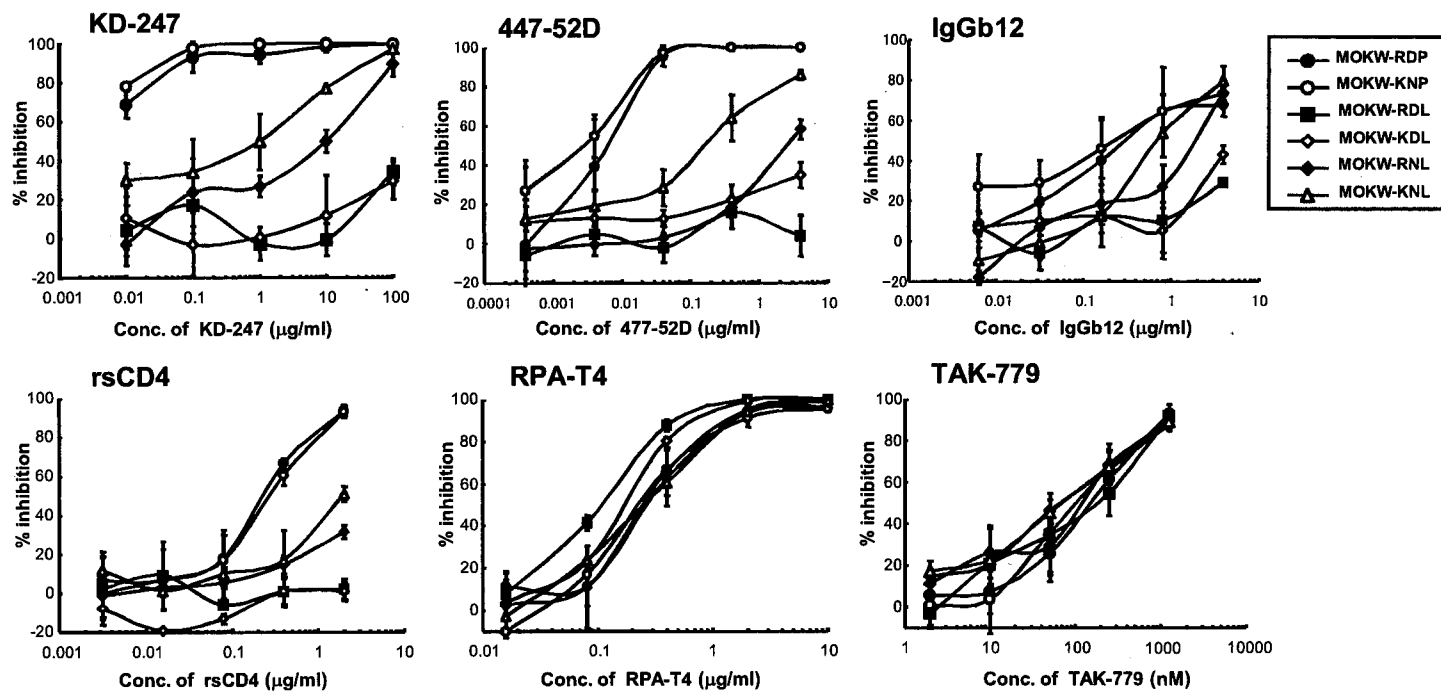


図9 細胞表面発現MOKW Envへの抗体結合活性の比較

(A)MOKW Env発現ベクターを293Tへtransfectionし、24時間後、KD-247を結合させてFACSで結合活性を測定した。GFPが発現している細胞にゲートをかけて、Envが発現している細胞のKD-247結合活性を測定した。ドットはネガティブコントロールの健常人IgGである。各グラフの右上の数字はMFIを表している。(B)MOKW Env発現細胞表面上へのKD-247、447-52D、17bの結合活性を示している。MOKW-RDPのMFIを1.0とした時のMFIの相対的値(Relative MFI)で表している。

図10



50

図10 MOKW V2変異体pseudotype virusの単クローン抗体、rsCD4、抗CD4抗体、CCR5阻害薬に対する中和感受性の比較

KD-247、447-52D、rsCD4、IgGb12を100TCID₅₀のV2変異MOKW pseudotype virusと15分間インキュベートし、標的細胞のGHOST-hi5細胞へ加えた。TAK-779とRPA-T4はGHOST-hi5へ加えたあと15分間インキュベートし、その後MOKW pseudotype virusを加えた。2日後ルシフェラーゼ活性を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

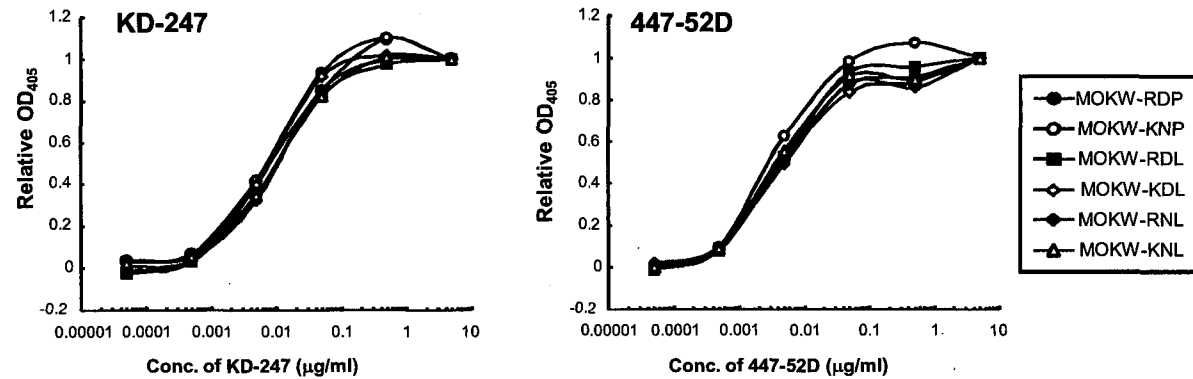


図11 MOKW V2変異単量体Envへの抗V3抗体の結合活性の比較

界面活性剤NP-40含んだ緩衝液でpseudotype virusを含む培養上清を処理し、抗gp120-C5 sheep抗体を介して単量体gp120をELISAプレートに結合させた。その単量体gp120に任意の濃度に希釈した抗V3抗体 (KD-247、447-52D) を加え、抗ヒトIgG-Peroxidaseを2次抗体として反応させ、基質を加えて吸光度(405nm)を測定した。V2変異Envの量が異なるため、抗V3抗体が飽和した濃度(5mg/ml)で標準化して吸光度 (Relative OD₄₀₅) 比べた。

図12

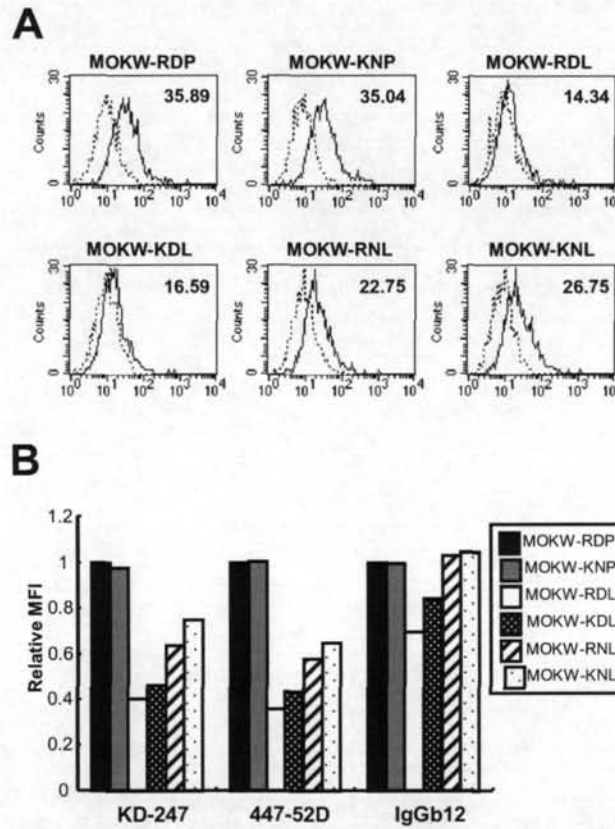


図12 細胞表面発現V2変異MOKW Envへの抗体結合活性の比較

(A)MOKW Env発現ベクターを293Tへtransfectionし、24時間後、KD-247を結合させてFACSで結合活性を測定した。GFPが発現している細胞にゲートをかけて、Envが発現している細胞のKD-247結合活性を測定した。ドットはネガティブコントロールの健常人IgGである。各グラフの右上の数字はMFIを表している。(B)MOKW Env発現細胞表面上へのKD-247、447-52D、IgGb12の結合活性を示している。MOKW-RDPのMFIを1.0とした時のMFIの相対的値(Relative MFI)で表している。

図13

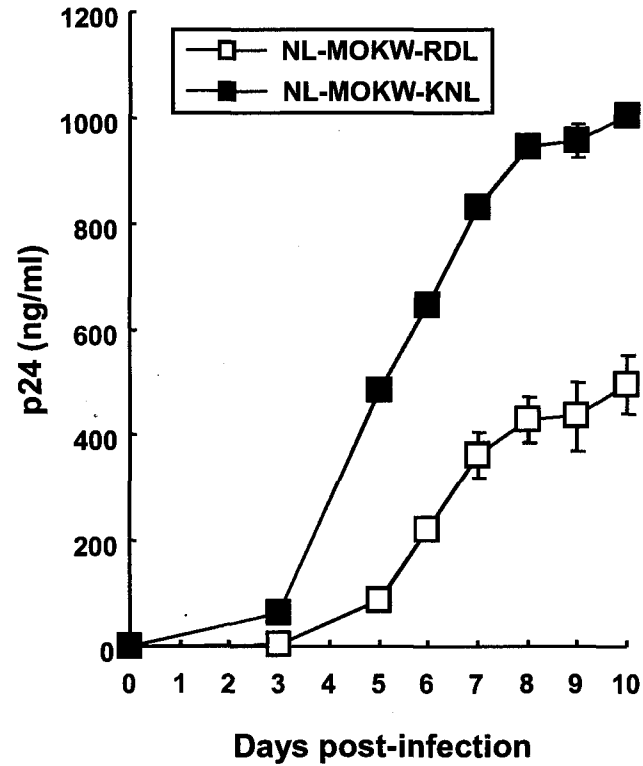


図13 PM1/CCR5細胞におけるNL-MOKW-RDLとNL-MOKW-KNLの増殖速度の比較

1x10⁴個のPM1/CCR5細胞と10ngのp24量に相当するNL-MOKWキメラウイルスを混ぜ、37℃で4時間インキュベートした。4時間後、遠心分離して上清を取り除いた。3mlの10%FCSを含んだRPMI1640に再懸濁し、10日間培養した。ウイルス増殖はp24抗原量を測定することにより比べた。

図14

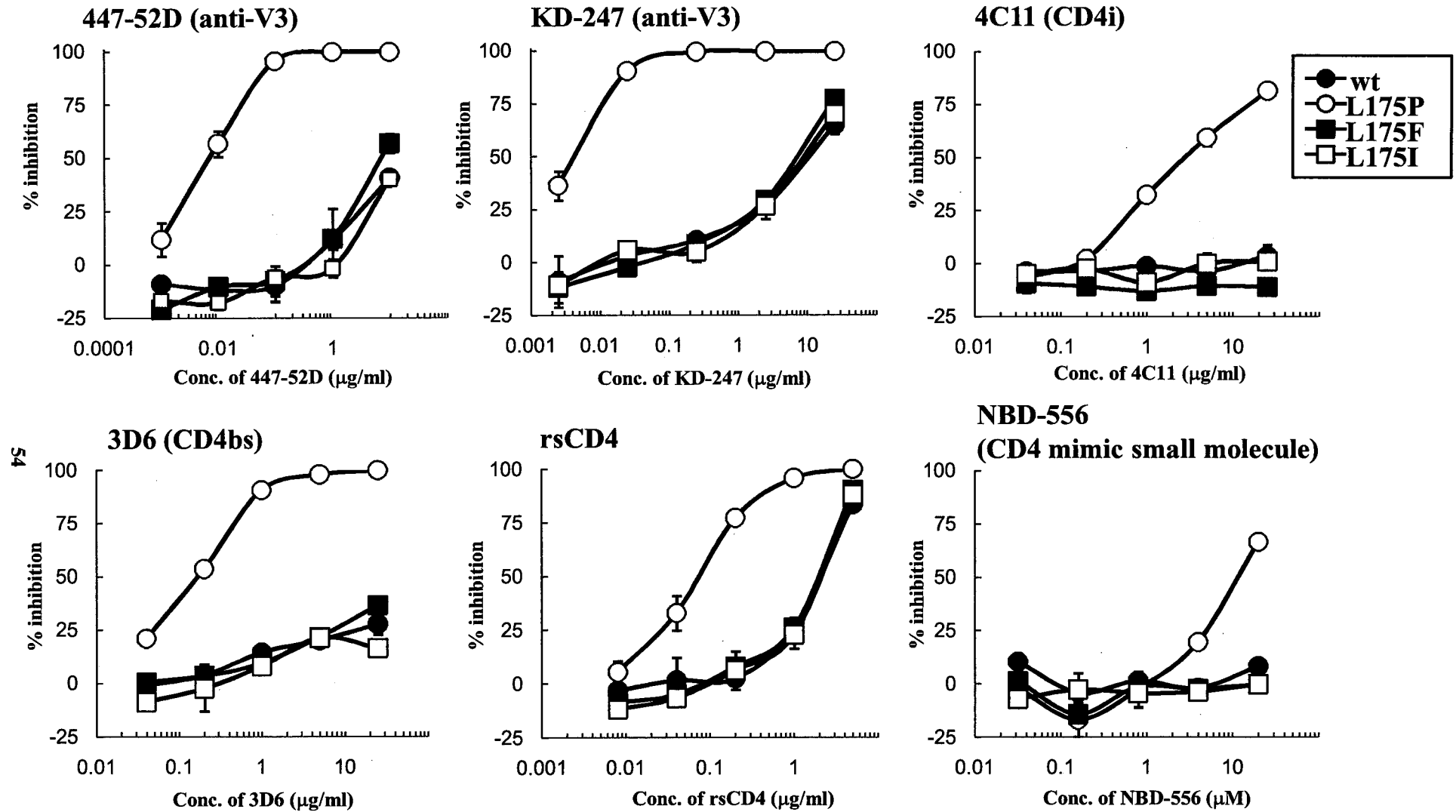


図14 単クローン抗体、rsCD4、CD4bs結合侵入阻害薬に対するJR-FL pseudotype virusの中和感受性の比較

447-52D、KD-247、4C11、3D6、rsCD4、NBD-556を500TCID₅₀のJR-FL pseudotype virusと15分間インキュベートし、標的細胞のTZM-bl細胞へ加えた。2日後β-galactosidase活性を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

図15

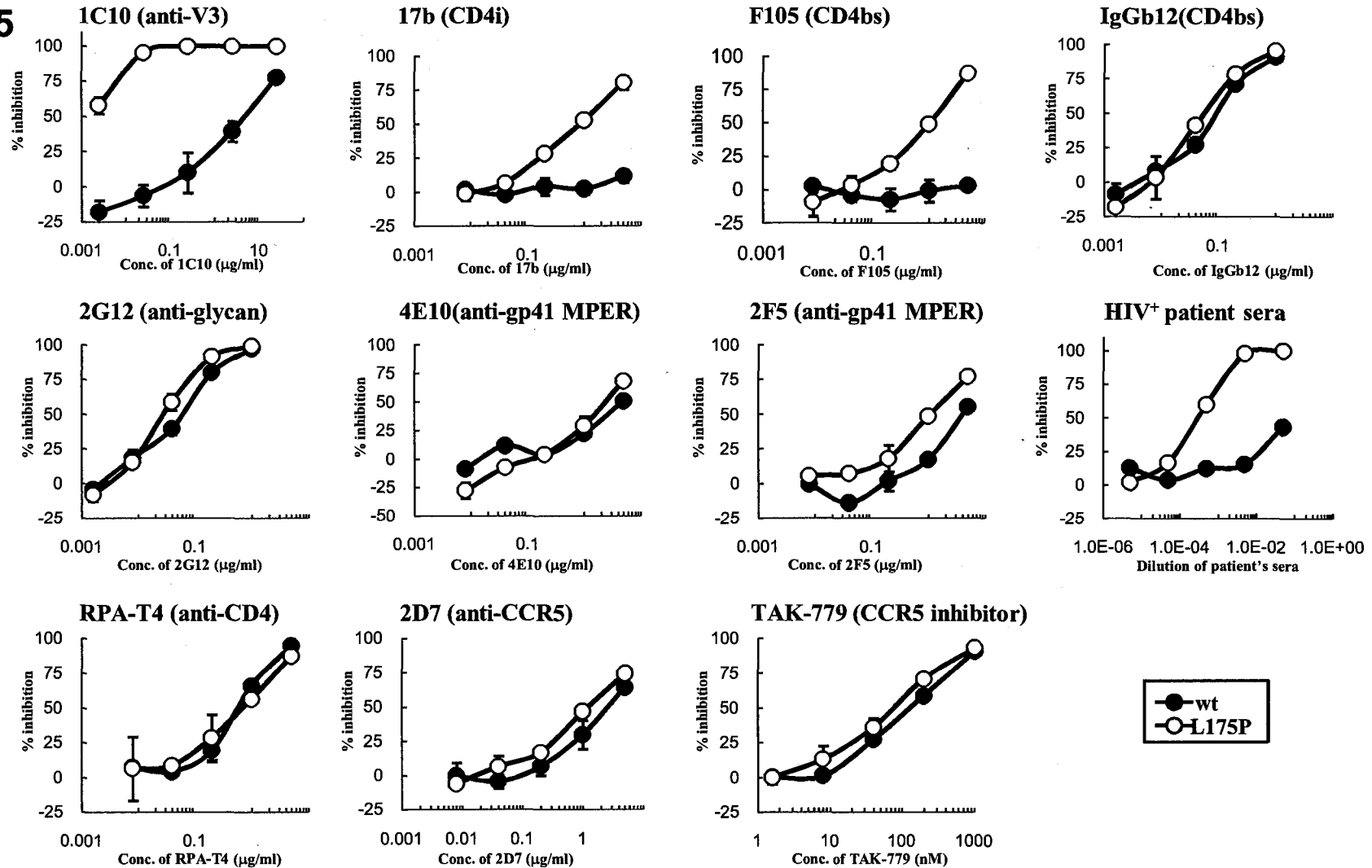


図15 単クローン抗体、抗CCR5抗体、抗CCR5阻害薬、抗CD4抗体、LTNP患者由来血清に対するJR-FL pseudotype virusの中和感受性の比較

1C10、17b、F105、IgGb12、2G12、4E10、2F5、を500TCID₅₀のJR-FL pseudotype virusと15分間インキュベートし、標的細胞のTZM-bl細胞へ加えた。RPA-T4、2D7、TAK-779はTZM-blへ加えたあと15分間インキュベートし、その後pseudotype virusを加えた。2日後β-galactosidase活性を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

表3 JR-FL pseudotype virusに対する単クローン抗体、阻害薬の抗HIV効果

Target	Antibody or inhibitor		IC ₅₀ ^a		Fold change
			JR-FLwt	JR-FL(L175P)	
Anti-V3 MAbs	447-52D	(μg/ml)	>10	0.0071	>1405.74
	KD-247	(μg/ml)	7.86	0.0045	1747.74
	1C10	(μg/ml)	5.65	<0.0025	>2258.08
CD4-induced MAbs	17b	(μg/ml)	>5	1.75	>2.86
	4C11	(μg/ml)	>25	2.87	>8.70
CD4 binding site MAbs	F105	(μg/ml)	>5	0.84	>5.96
	3D6	(μg/ml)	>25	0.14	>181.67
	IgGb12	(μg/ml)	0.076	0.045	1.70
CD4 binding site	rsCD4	(μg/ml)	1.69	0.06	28.75
	NBD-556	(μM)	>20	11.38	>1.76
Anti-N-glycan	2G12	(μg/ml)	0.058	0.027	2.2
Anti-gp41	2F5	(μg/ml)	4.01	1.09	3.68
	4E10	(μg/ml)	4.79	2.36	2.03
Anti-CCR5	TAK-779	(nM)	128.9	76.46	1.69
	2D7	(μg/ml)	3.66	1.53	2.40
Anti-CD4	RPA-T4	(μg/ml)	0.72	0.60	1.20

^a様々な濃度の単クローン抗体や阻害薬存在下で 2×10^4 のTZM-bl細胞に500TCID₅₀のJR-FLwtまたはJR-FL(L175P)を感染させた。感染後2日目の細胞のβ-galactosidase活性を測定し、IC₅₀の値を決定した。結果は独立した2-3回の実験を平均した値を示す。

図16

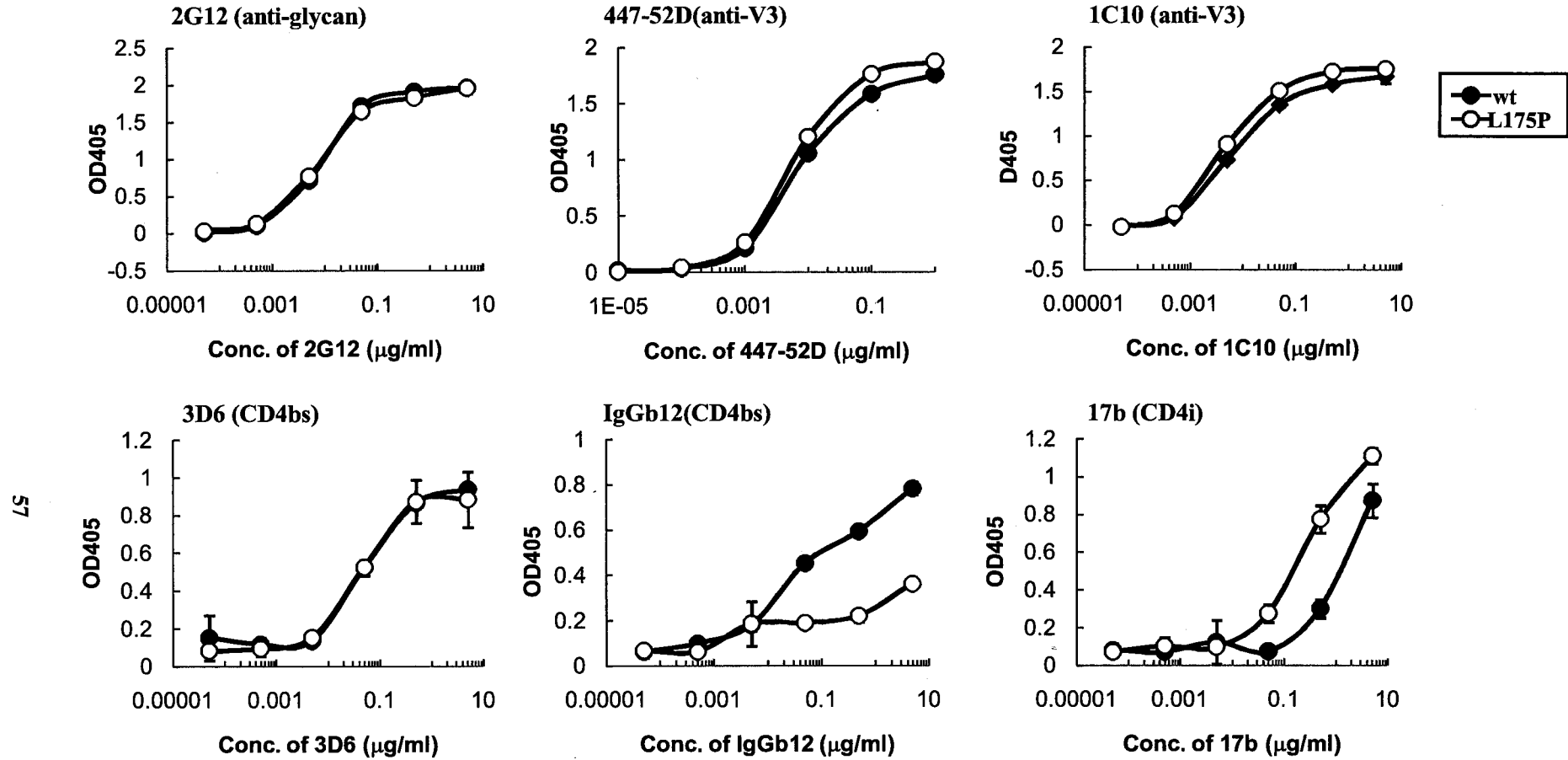
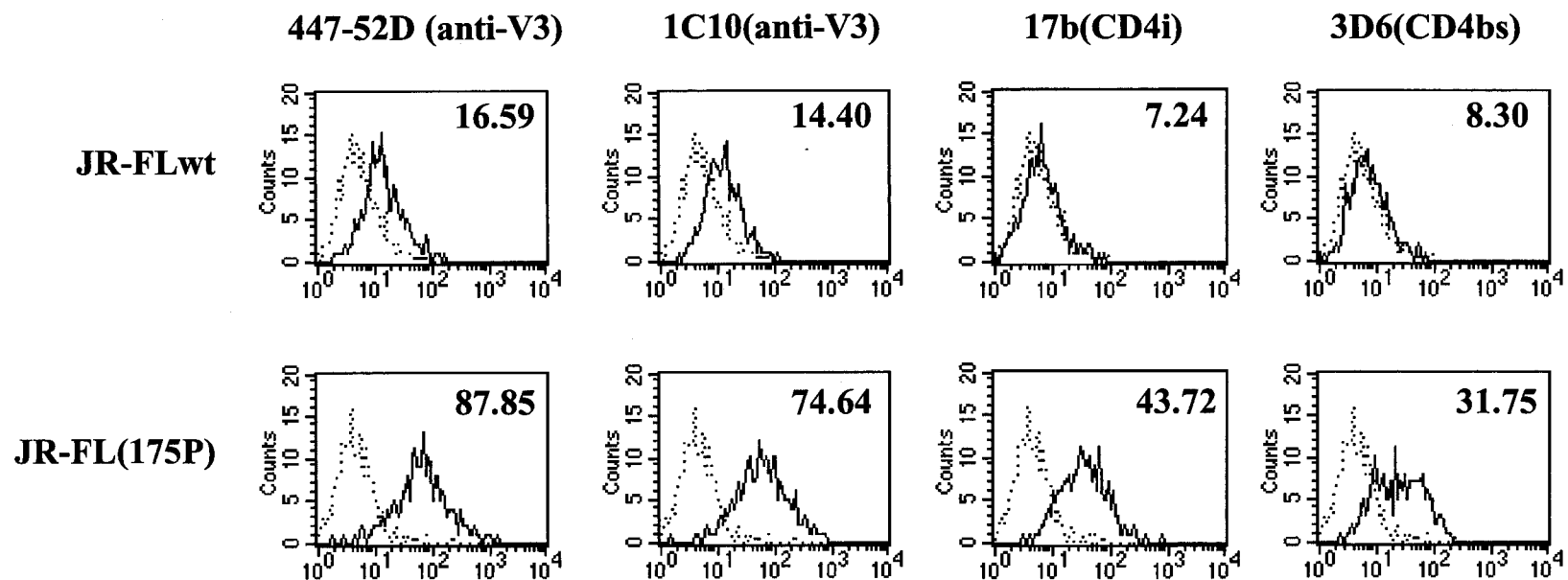


図16 JR-FL単量体Envへの抗V3抗体の結合活性の比較

界面活性剤NP-40含んだ緩衝液でpseudotype virusを含む培養上清を処理し、抗gp120-C5 sheep抗体を介して単量体gp120をELISAプレートに結合させた。その単量体gp120に任意の濃度に希釈した抗Env抗体 (2G12、447-52D、1C10、3D6、IgGb12、17b) を加え、抗ヒトIgG-Peroxidase を2次抗体として反応させ、基質を加えて吸光度(405nm)を測定した。

図17



85

図17 JR-FLwtおよびJR-FL(L175P) Envを発現した細胞表面への単クローン抗体結合活性

293T細胞へJR-FLwtまたはJR-FL(L175P)Env発現ベクターをtransfectionし、24時間後細胞を回収して単クローン抗体で染色した。Env発現ベクターにはIRES配列とGFP遺伝子が挿入されている。GFP陽性細胞にゲートをかけることでEnv発現細胞への抗体結合活性を測定した。ネガティブコントロールとして健常人IgGを使用した(点線)。結果は3回実験を行ったうちの1回の結果である。各グラフの右上に書かれている数字はMean Fluorescence Intensity (MFI)を示している。

図18

59

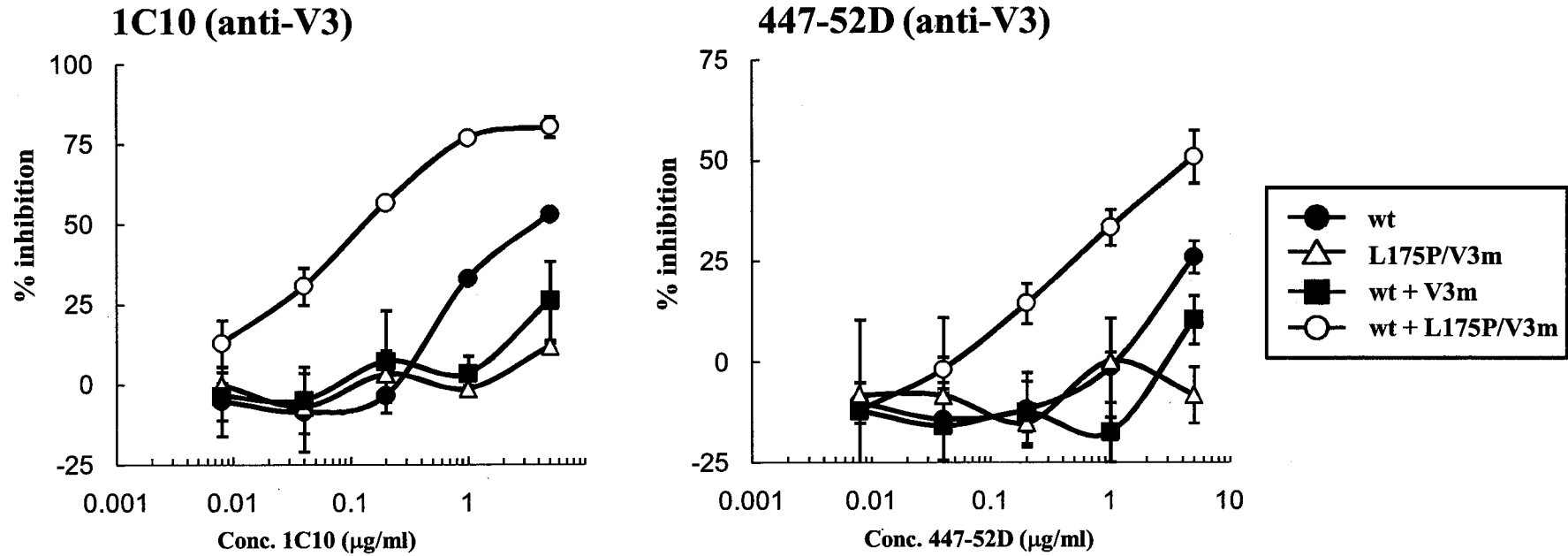


図18 JR-FLwtおよびJR-FL(L175P/V3m) ヘテロ三量体Envをもったpseudotype virusの中和感受性

293T細胞へJR-FLwtおよびJR-FL(L175P/V3m)またはJR-FL(V3m)Env発現ベクターとパッケージングベクター(pSG3ΔEnv)をco-transfectionし、24時間後pseudotype virusを回収した。抗V3抗体1C10、447-52Dを500TCID₅₀のpseudotype virusと15分間インキュベートし、標的細胞のTZM-bl細胞へ加えた。2日後β-galactosidase活性を測定し、抗ウイルス活性を評価した。