

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 布 矢 純 一

本研究は HIV 感染における特異的抗原提示の解析を行う手法を確立することを目的として、HIV Nef タンパク質由来抗原ペプチドを提示した HLA-A24 分子と特異的に結合する単クローン抗体の作製を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 免疫したマウスよりハイブリドーマ法を用いて抗体を作製し、1920 のハイブリドーマをスクリーニングしたところ、A24/Nef 複合体に結合する 50 のハイブリドーマを樹立した。これは、解析したハイブリドーマの 2.6%であった。また、限界希釈法によりクローニングして得られた単クローン抗体は、ほとんどのクローンが β 2m を認識していた。
2. 免疫マウス由来単鎖抗体ファージディスプレイライブラリーから、23 クローンの単鎖抗体提示ファージをクローニングした。単鎖抗体提示ファージを用いて A24/Nef 複合体との結合特異性を解析し、10 クローン(43.5%)の単鎖抗体を樹立した。これらのクローンは、すべて A24/Env 複合体にも結合し、A24/Nef 複合体に特異的な結合を有する単クローン抗体ではなかった。
3. 非免疫ヒト由来単鎖抗体ファージディスプレイライブラリーから、80 クローンの単鎖抗体提示ファージをクローニングした。単鎖抗体提示ファージを用いて結合特異性を解析したところ、16 クローン(20%)が A24/Nef 複合体に特異的に結合した。単クローン抗体の塩基配列を決定し、重複したクローンを除去すると、A24/Nef 複合体に特異的に結合する 8 クローンの単鎖抗体を樹立できた。

4. A24/Nef 複合体に特異的に結合する抗体は、全てのクローンにおいて、由来する germline segment が異なる組み合わせであった。また、CDR のアミノ酸配列に特徴的な配列は無く、多様な配列を有していた。
5. Gag28、Env584、CMV pp65 由来の HLA-A24 拘束性抗原ペプチドをパルスした HLA-A24 陽性細胞及び HLA-A24 陰性細胞は、樹立した単クローン抗体により染色されなかった。一方、HLA-A24 拘束性 Nef138 抗原ペプチドをパルスした HLA-A24 陽性細胞のみ樹立した抗体で染色された。また、蛍光染色により得られた蛍光強度は、クローン 3 で染色した場合よりもクローン 27 で染色した場合の方が高かった。
6. 組換えバキュロウイルスを用いて、完全ヒト型 IgG の発現系を構築した。この発現系を用いて作製した完全ヒト型 IgG は、同じ可変領域の配列を持った単鎖抗体の結合特異性を再現していた。
7. 表面プラズモン共鳴法を用いた抗原抗体反応の解析から、クローン 3 の K_D は $23\mu\text{M}$ 、クローン 27 の K_D は $20\mu\text{M}$ であることが分かった。

以上、本論文では HIV Nef タンパク質由来抗原ペプチドである Nef138 を提示した HLA-A24 分子と特異的に結合する単クローン抗体の樹立及びその性状の解析を行った。本研究で樹立した単クローン抗体は、HIV 由来抗原ペプチドを提示した HLA-A24 分子と特異的に結合する単クローン抗体の初めての報告である。また、これまで未知に等しかった HIV 特異的な抗原提示を解析する方法の一つとして、HIV 特異的な抗原提示の解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。