

論文の内容の要旨

論文題目 エイズモデルにおけるウイルス特異的非中和抗体に関する研究

氏名 中根 拓

1. 背景

米国においてエイズ症例の報告がなされてから 30 年以上経つ現在、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 感染者数は 3,400 万人と推定され、年間 180 万人がエイズ (AIDS: 後天性免疫不全症候群) によって死亡していると考えられている。新規感染者数の増加を抑制するための手段としてエイズワクチン開発は重要な意義を持つ。この中で、ワクチンによる液性免疫誘導の対象として、ウイルス特異抗体の有する中和活性以外のエフェクター活性に近年関心が集まっている。特にタイで実施されたカナリアポックスベクタープライムに続きリコンビナントエンベロープタンパク質 gp120 でブーストを行った RV144 の臨床試験が一定水準の感染防御効果を呈し、感染防御に対する HIV エンベロープへの結合抗体の寄与の可能性が強く示唆されている。

中和活性を有さない結合抗体の作用機序の一端として抗体介在性のエフェクター活性が挙げられる。HIV/SIV 結合抗体は試験管内でエフェクターとの共培養時に抗体依存性細胞介在性ウイルス複製抑制能 (ADCVI) を呈することが報告されており、個体内においても HIV-1/SIV 感染初期から ADCVI 活性を有する結合抗体が誘導され、感染急性期および慢性期血漿が呈する ADCVI 活性と血漿中ウイルス量が逆相関することが示されている。しかし、結合抗体とウイルス複製抑制の因果関係については、サルエイズモデルにおいて中和活性を有さない結合抗体を経粘膜感染成立前に粘膜部位に投与した受動免疫実験による部分的な感染阻止が一例報告されるに留まり、ワクチンによる免疫誘導でもっとも想定される抗体の全身性の特に血中分布がウイルス感染経過に及ぼす影響、とりわけ自然感染でみられる経粘膜感染の成立以後のウイルスの複製制御における影響は明らかではない。

当研究室では、SIV 感染サルエイズモデルにおいて、抗 SIV ポリクローナル中和抗体の感染 7 日後の経静脈の受動免疫により個体レベルの長期にわたるウイルス複製制御が生じ、その作用として抗体の Fc 領域依存的なウイルス粒子の樹状細胞への取り込み亢進を介したウイルス特異的 T 細胞の機能亢進が生じる可能性を明らかにしている。そこで本研究では、サルエイズモデルにおいて、中和活性を有さない非中和結合抗体を感染 7 日後に経静脈で受動免疫を行い、個体レベルでの感染経過に及ぼす影響の検証を行った。本研究は、中和抗体の感染後受動免疫によって観察されたウイルス複製制御における中和活性の必要性に加え、中和抗体と比してワクチンでの誘導がより現実的な非中和結合抗体の全身性の分布が感染成立後の個体内のウイルス感染経過に対し観察可能なレベルで影響し得るかという点につきの評価を試みるものである。

2. 結果

2.1 抗 SIV 非中和結合抗体が示した SIV 結合性及び抗ウイルス活性

受動免疫に用いる抗 SIV 非中和結合抗体を得る目的で、SIVmac239 チャレンジを行ったアカゲサルの慢性期血漿より、Protein G によりポリクローナル抗体をアフィニティー精製し、中和活性が検出限界以下であった 10 個体由来のポリクローナル抗体（非中和抗体）を得た。

非中和抗体に含まれる感染性ウイルス粒子に結合性を示す抗 SIV 抗体の確認を目的として、ウイルス脂質二重膜を保持可能な界面活性剤非存在下で SIVmac239 感染性粒子への結合性を検証する粒子 ELISA 系を新規に確立した。粒子 ELISA で SIV へ結合性を示す抗体の有無を検証した結果、100 µg/ml の抗体濃度において、中和抗体の OD_{450 nm} における吸光度は、非感染個体より精製を行ったコントロール抗体が示した吸光度を上回る OD 値を示し、本法が抗 SIV 抗体の存在を示すと考えられた。非中和抗体は中和抗体の吸光度に比して高度あるいは同程度の OD 値を示した抗体と、より低度の OD 値を示した抗体の二群が得られた。

本法が SIV 粒子表面に存在する エンベロープタンパク質への抗体の存在比を反映しているかを検証する目的で、SIV 各タンパク質の直鎖抗原に対するウェスタンブロットを非中和抗体を一次抗体として行った。その結果、ウェスタンブロットで結合抗体の存在比が低いことが示された抗体の反応性は粒子 ELISA での OD 値も低く、粒子 ELISA がポリクローナル抗体中の抗 SIV 結合抗体の存在比を反映することが認められた。

次に、SIVmac239 感染サル T 細胞株（HSC-F）とサル由来末梢血単核球（PBMC）を上記抗体の存在下で 7 日間共培養し、上清中の構造タンパク質 p27 濃度を測定し ADCVI 活性を評価した。その結果、非中和結合抗体カクテルはコントロール抗体に比して 0.1 および 1.0 mg/ml のいずれの濃度で 97%以上の ADCVI 活性を示すことを確認した。抗体濃度 1 mg/ml は、アカゲサルの血液量を 300 ml と概算した際の、300 mg の投与抗体の血中抗体濃度に相当し、受動免疫直後の血中抗体濃度と同程度

の濃度において非中和結合抗体は *in vitro* でのウイルス複製抑制能を有することを確認した。加えて、粒子 ELISA で示された非中和結合抗体の存在比と ADCVI 活性が類似する傾向が示され、確立した ELISA 系が感染性粒子あるいは感染細胞への抗体の結合性を反映することが示唆された。

2.2 サルエイズモデルにおける非中和結合抗体の感染後受動免疫実験

SIV 結合能および *in vitro* での複製抑制能を確認した非中和結合抗体が、サルエイズモデルにおいて感染急性期に全身性に存在することで感染経過に及ぶ影響を検証する目的に非中和結合抗体の受動免疫実験を行った。計 11 頭のアカゲサルに SIVmac239 を経静脈接種し、感染 7 日後に非中和結合抗体カクテルないし非感染個体由来コントロール抗体 300 mg の経静脈投与を実施した。非中和結合抗体投与群および対照群は SIVmac239 チャレンジ後にピーク、セットポイント期と共に典型的な高レベルのウイルス血症を呈し、群間の血漿中ウイルス量はチャレンジ後より 24 週に渡り有意な差を示さなかった（感染後 12 週において $p=0.61$ ）。CD4 陽性 T 細胞数も感染後 24 週に亘り両群の細胞数の推移には差は認められず（感染後 12 週において $p=0.87$ ）、感染後 12 週での CD28 陽性 CD95 陽性セントラルメモリー CD4 陽性 T 細胞数および Total メモリー CD4 陽性 T 細胞数についても、非中和結合抗体投与群は対照群と比較して有意な差を認めなかった（ $p=0.52$ 、 $p=0.75$ ）。

抗体投与前後の急性期の血漿を用いた SIV 各抗原に対するウェスタンブロットを行った結果、非中和結合抗体受動免疫群特異的に、抗体投与後 2 週にわたり抗 SIV エンベロープ抗体が血漿中に存在する状況にあったことが示された。非中和結合抗体投与によるウイルス特異的細胞性免疫の誘導の有無を明らかにする目的で、感染慢性期におけるウイルス特異的 CTL レベルを検証した結果、感染後 26-30 週での各タンパク質の特異 CTL レベルの幾何平均は両群間において有意な差を示さなかった（Env: $p=0.87$ 、Gag: $p=0.84$ ）。さらに変異ウイルスの選択圧に対して、非中和結合抗体投与が直接的あるいは細胞性免疫の誘導を介して間接的に影響を及ぼした可能性を検証することを目的に、慢性期血漿中ウイルス RNA の塩基配列を解析し、ウイルスゲノムに蓄積された変異について検証した結果、群特異的なアミノ酸変異は観察されなかった。

3. 考察

SIV 非中和結合抗体は *in vitro* において SIV 粒子結合性と ADCVI 活性を示した一方、サルへの感染後受動免疫では持続感染阻止能を示さなかったことから、感染が成立した状況における非中和結合抗体の全身性の分布はウイルスの複製制御に影響を及ぼすには不十分である可能性が高いという重要な知見が得られた。加えて、感染成立後の SIV 特異的中和ポリクローナル抗体の受動免疫による長期にわたるウイルス複製抑制効果において、抗体の中和活性が必要であることが新たに示された。本ウイルス複製抑制機序として、樹状細胞へのウイルス粒子取り込み増加によるウイルス特異的 T 細胞への抗原提示亢進機能と、その結果として高機能性ウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞の誘導が示されている。樹状細胞へのウイルス粒子取り込み増加は非中和結合抗体においても成立可能であるが、本研究で得られた知見を鑑みると、抗体による抗原提示細胞への抗原取り込み亢進単独ではウイルス複製制

御において不十分であり、中和抗体によって、ウイルス特異的 T 細胞誘導に関与する CD4 陽性 T 細胞をウイルス感染から防御することが、感染成立後のウイルス複製抑制の機序において重要な可能性が高いことが示唆された。

本研究は、非中和抗体の SIV 感染成立後のウイルス複製制御への寄与はほとんど無いということを初めて明らかにし、感染成立後のウイルス複製制御においては感染急性期の CD4 陽性 T 細胞の破綻を防ぐことの重要性を提示した。一方で、本結果はワクチンによる誘導対象としての非中和結合抗体の有用性を全面的に否定するものではなく、粘膜局所における感染前の分布がサルエイズモデルにおいて感染リスクを一定程度低下させること、エイズワクチン RV144 の臨床試験において感染リスクの低下とエンベロープタンパク質への抗体の結合性が相関しその寄与が示唆されていることから、非中和結合抗体誘導の局所での感染防御への関与については今後の研究課題である。本研究成果は有効な免疫反応の選択的誘導を必要とするエイズワクチン開発において重要な知見を提供するものである。