

No.	25-3143	
Project Title	広域かつ強力な中和活性の両立を目指したHIV中和抗体の開発	
Principal Investigator	Jose Caaveiro (Kyushu University・Professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	kouhei Tsumoto (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	妹尾 暁暢 (九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野・助教)
	Project Member (s)	朝倉 陽菜 (九州大学大学院薬学府蛋白質創薬学分野・修士課程 (1 年生))
	Project Member (s)	森川 聖弥 (九州大学大学院薬学府蛋白質創薬学分野・修士課程 (2 年生))
	Project Member (s)	藤島 果琳 (九州大学大学院薬学府蛋白質創薬学分野・修士課程 (1 年生))
	Project Member (s)	笠原慶亮 (九州大学大学院薬学研究院蛋白質創薬学分野・助教)
	Project Member (s)	久保泰斗 (九州大学薬学部蛋白質創薬学分野・学部生(4年生))
	Project Member (s)	安田智徳 (九州大学薬学府蛋白質創薬学分野・博士課程(2年生))

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書(年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (年次終了)

▶背景・目的

HIV(ヒト免疫不全ウイルス)はAIDS(後天性免疫不全症候群)の原因ウイルスである。1983年の発見から40年以上が経過した今も年間63万人もの死亡例が報告されている。HIVは患者の獲得免疫を破壊することから、ヒトに備わった免疫に依存した治療は困難である。そのため、**ウイルスを標的とした抗体医薬品によるウイルス感染の阻害(=中和)**が治療戦略の柱の一つとなっている。

本研究では、多くの変異株においても保存性が高い膜近傍領域(MPER)を認識する中和抗体の高機能化を目的としている。MPERを認識する抗体の問題点は、抗体が膜近傍へ到達しにくく、結果として抗MPER抗体の中和能も弱いことである。申請者らはこれまでに、抗MPER抗体の結合力を高める技術として、**芳香族化合物ピレン**を抗体へ修飾する戦略を考案している。これは、ピレンがウイルスの膜内へと“杭”のごとく突き刺さり、抗体を膜近傍領域に効率的に近接できるためであると考えられている。

本プロジェクトではこのピレン修飾型MPER抗体の高活性メカニズムの解明とさらなる抗体エンジニアリングに取り組んだ。

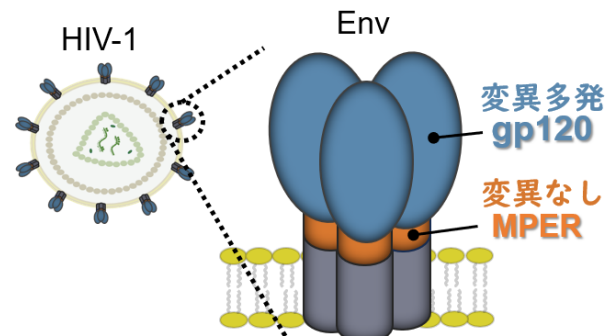


図1 HIVのEnvタンパク質. 変異の入り易いgp120と変異の入りにくいMPERからなる。

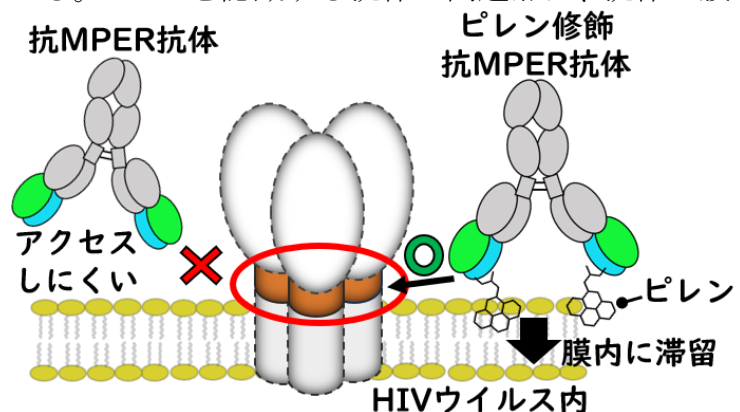


図2 ピレン修飾抗MPER抗体はウイルス膜へ近接近化し、MPERへアクセスしやすい。結果的に強い結合能を発揮できる。

▶結果

①脂質二重膜模倣分子ナノディスクの構築

ピレン修飾によって脂質二重膜に包埋された抗原MPERへの結合力が向上することを定量的に検証するために、*in vitro*の脂質二重膜模倣技術であるナノディスクをMPERペプチドへと応用した。

ナノディスクはMPER、脂質二重膜、ベルトタンパク質の3要素から構成される。精製時のゲルろ過クロマトグラフィおよび、純度確認のためのSDS-PAGEから極めて純度高くナノディスク包埋MPERを構築できたことが明らかになった(次項図4)。本サンプルを用いることで、抗MPER抗体に対してピレン修飾を施した際の結合力を定量的に判断できるプラットフォームが構築されたこととなる。

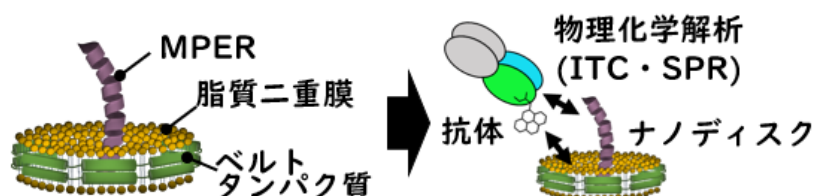


図3 ナノディスク包埋型MPER. ナノディスクは溶液中において膜タンパク質の脂質二重膜環境を模倣でき、SPRやITCといった精密な相互作用解析が可能になる。

②ピレン修飾抗体の相互作用解析

続いて、①で調製できたナノディスクを用いてMPER抗体に対するピレン修飾が実際にどの程度膜近傍に存在する抗原への結合力を向上させるのかを検証するために、相互作用解析を実施した。

この際、代表的な相互作用解析系として、表面プラズモン共鳴(SPR)法および、等温滴定型カロリメトリー(ITC)の二種を活用した。SPRを用いた解析においては、ピレン修飾の有無にかかわらずemptyナノディスク(MPERを包埋していないナノディスクであり、Negative controlとして用意したサンプルである)に対しても非特異的な結合が確認された。

一方、ITCではemptyナノディスクに対する結合は確認されなかった。一般にITCは相互作用時の発熱性相互作用を検出するため、非特異的な結合を検出しなかったと考えられる。そこで、ITCによってさらなる測定を進めた。ナノディスク包埋型のMPERに対してピレン修飾の有無で抗体の親和性を測定すると、ピレン未修飾時は130 nMの解離定数だったのに対し、ピレン修飾抗体では2.2 nMまで解離定数が小さくなり、著しい結合力の上昇が確認された(図5)。これによって、当初の想定通りピレンによる膜近傍環境への結合力の向上が確認され、その効果は59倍にも及ぶものであることが初めて明らかになった。

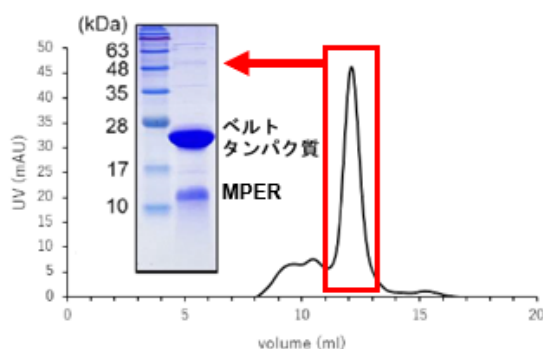


図4 ナノディスク包埋型MPERの調製・精製時のサイズ排除クロマトグラフィおよびSDS-PAGE.

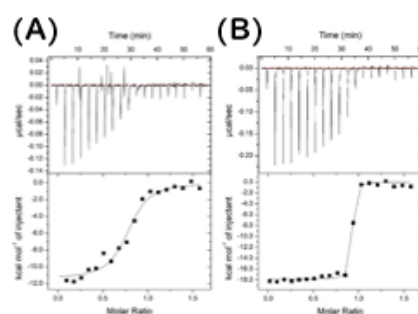


図5 ITCを用いたナノディスク包埋型MPERとMPER抗体の相互作用解析. (A)ピレン修飾なし、(B)ピレン修飾ありの抗体を使用.

▶総括

本年度の研究によって、ピレン修飾した抗体の膜近傍への結合力を定量的に測定するプラットフォームがITCにおいて構築された。また、ピレン修飾抗体は膜環境への非特異的な結合によって望まぬ細胞応答を引き起こすことも先行研究で報告されている(Rujas *et al.*, *Cell Rep.*, 2020)。その観点では、あえて非特異的な結合を検出する測定系の存在も重要になると言える。本研究で構築したSPRの測定系は、そのような非特異的な結合さえも検出するものであり、まさにこの目的に適うものであった。以上のように、共同研究を活用した多角的な相互作用解析手法と申請者らが有するナノディスク構築技術を融合させることによってHIVに対する次世代の中和抗体のメカニズム解明に向けた研究を推進することができた。