

## 特集：HIV と免疫

## 抗 HIV 中和抗体

## Anti-HIV Neutralizing Antibodies

柴田 潤二, 松下 修三\*

Junji SHIBATA and Shuzo MATSUSHITA

熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 (\*教授)

Division of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research,  
Kumamoto University

## 中和抗体的作用

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus : HIV) は、標的細胞の受容体との反応部位を持つ gp120 (SU) と、ウイルスと標的細胞の膜融合に重要な gp41 (TM) の二つのサブユニットからなるエンベロープタンパク (ENV) を持っている。HIV に対する中和抗体は、gp120, gp41 を認識し、HIV の細胞への感染、増殖を阻害する。中和の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。① 中和抗体はウイルス粒子表面の Env と結合し、ウイルス粒子と標的細胞上の受容体との相互作用を阻害する。② ウイルス粒子と標的細胞膜との膜融合過程を阻害する。膜融合阻害は、主に抗 gp41 抗体が関与する<sup>1)</sup>。

他のウイルス感染に対する中和抗体の中には、ウイルス粒子と標的細胞との膜融合後、ウイルスの増殖を抑制するものが知られているが<sup>2)</sup>、HIV に関してはまだ報告がない。この他、抗ウイルス活性を示す抗体に、ウイルス同士を凝集させて貪食細胞による食作用を促す抗体や、ウイルスに結合したあと、補体を活性化させる抗体、抗体依存型細胞傷害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC) を引き起こす抗体などが知られている。HIV に対してこれらの機能をもつ抗体も報告されている<sup>3,4)</sup>。

## HIV の感染過程と抗 HIV 中和抗体の標的

エンベロープタンパクである gp120 は、variable region (V1-V5) と呼ばれるアミノ酸変異の頻度が高く、loop を形成する領域と、それ以外の conserved region (C1-C5) からなる糖タンパクである。gp41 と非共有結合でダイマーを作っており、ウイルス膜表面上でそれらが三量体のコンプレックスを形成していると考えられている<sup>5)</sup>。gp120 は、標

的細胞の CD4 と相互作用することで立体構造を変化させ、それにより露出した領域に、ケモカインレセプター (CCR5 または CXCR4) が結合する。続いて gp41 が立体構造を変え、標的細胞膜を貫通し、HIV と標的細胞膜が融合して感染が成立する。中和抗体はこれらエンベロープタンパクを主な標的としている (表 1, 図 1)。現在知られているエンベロープタンパクを標的としている中和抗体は、CD4 との結合領域に結合する抗体 (CD4 binding domain ; CD4bd)、CD4 と結合し、立体構造が変わることで露出するエピトープに結合する抗体 (CD4 induced ; CD4i)、V2 や V3 領域に結合する抗体、gp120 の糖鎖に結合する抗体、gp41 と結合し、標的細胞との膜融合を阻害する抗体などがある。

強い中和活性を示し、広範囲な株を中和できる抗体を誘導するような免疫原を探索するため、HIV 感染者から様々な中和単クローン抗体が分離され、研究されている。

## (1) CD4bd 抗体

gp120 の CD4 結合領域は、HIV 株間で高度に保存された立体構造依存性の領域である。そのため、この領域を標的とする抗体は、HIV の広い株を中和できると考えられていた。実際多くの CD4bd 抗体は、T cell tropic ウイルスを中和できることが分かっている。しかしそのほとんどは primary isolate を中和できない。その理由についてはまだはっきりとは分かっていない。

CD4bd 抗体の中で唯一、広範囲な HIV 株を中和できることで知られている IgG1b12 は、HIV 感染者の骨髄細胞から gp120 に結合する抗体の抗原結合部位を発現する遺伝子をクローニングして作られた抗体である。この抗体が primary isolate も中和できることから、CD4bd に対する抗体を *in vivo* で誘導することは、広範囲な株の感染を阻止できる可能性が示された<sup>6)</sup>。しかし Haynes らは、IgG1b12 を代表とする広範囲の HIV を中和できる抗体 (後に示す抗 gp41 抗体である 2F5, 4E10 を含む) は、自己抗原にも反応することを示した<sup>7)</sup>。これは IgG1b12 のような抗体を誘導

著者連絡先：〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野

2005 年 8 月 30 日受付

表 1 抗 HIV-1 エンベロープタンパク中和抗体と中和エピトープ

エピトープ	代表的な中和単クローン抗体	特徴
gp120 CD4-binding domain	IgGb12, 559/64D, 15e	免疫原性が高い。広範囲な中和は IgGb12 しか示さない。
gp120 CD4-induced epitope	17b, 48D	ケモカインレセプター結合領域を認識しているといわれている。抗原結合部位だけにした抗体 (Fab) には中和能がある。
gp120 $\alpha 1 \rightarrow 2$ mannose 残基	2G12	免疫原性が低い。広範囲なウイルス株を中和できる。
gp120 V2 loop	697D	免疫原性が高い。ウイルス株特異的な抗体がほとんどである。
gp120 V3 loop	447-52D, 2182, 0.5 $\beta$	免疫原性が高い。ウイルス株特異的な抗体が多いが、追加免疫法などで、広範囲のウイルス株を中和できる抗体が誘導できる。
gp41 transmembrane 近傍領域	2F5, 4E10, Z13	免疫原性が低い。サブタイプを超えた広範囲のウイルス株を中和できる。自己抗原 (Cardiolipin) にも反応する。

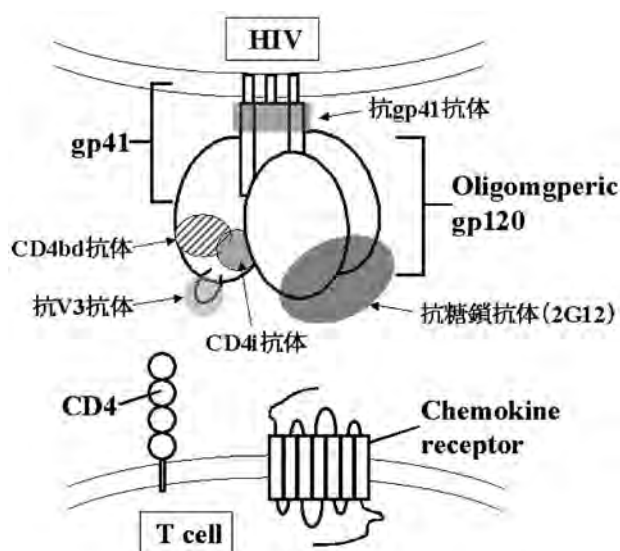


図 1 HIV エンベロープタンパクと中和抗体エピトープ

することは困難であること、つまり自己抗原に似た抗原を認識する抗体を誘導することは困難であることを示唆している。また、CD4bd 抗体は、抗原提示細胞による gp120 のプロセッシングを阻害し、エンベロープ特異的ヘルパー T 細胞の機能を阻害することも報告されている<sup>8)</sup>。このようなプロセッシングの阻害反応は、gp120 の別の領域をエピトープとしている中和抗体では示されていない。CD4bd 特異的抗体の誘導を目指したワクチンにはクリアしなければならない問題が多い。

(2) CD4i 抗体

最近の知見では、HIV 感染者のほとんどが CD4i 抗体を

保持していることが示された<sup>9)</sup>。しかし、それらの抗体は gp120 が CD4 と結合した後のどの領域に反応する抗体か感染者ごとに様々であり、同定できない。また血清中に存在する CD4i 抗体は soluble CD4 を加えないと作用しないため、生体内でウイルスのコントロールにどのように関与するのかは不明である。

いくつかの CD4i 単クローン抗体は結合する領域が同定されている。その一つである 17b は gp120 の V1/V2 stem 中の  $\beta$ -strand と C4 領域が形成するケモカインレセプター結合領域に結合する。ここへ結合する抗体は primary isolate を中和できない。しかし、抗原結合部位だけにした短い Fab fragment だと中和能を示す<sup>10)</sup>。CD4i 抗体は、HIV が標的細胞の CD4 と結合した後のエンベロープタンパクに結合するため、細胞と HIV との間に入れる大きさ (Fab < whole IgG) でないと中和しにくい可能性が示唆された。このエピトープを認識する抗体は、抗体自体の大きさも考慮に入れる必要がある。

(3) 抗 V2 領域抗体

V2 領域に対するポリクローナル抗体は、強力な中和能があることが示されている。しかし、この領域に対する抗体は、株特異的にしか中和できない。なぜなら V2 領域は同一サブタイプ間でさえ変異に富んだ領域であり、その領域のアミノ酸の長さも大きく異なるためである。

V2 ループ領域を除去したウイルスや、V1/V2 領域を除去したウイルスでも、複製能力は保たれたままであることから、V1/V2 領域はウイルスの複製に必須でないことが示された<sup>11)</sup>。また、この領域は V3 領域やケモカインレセプター結合領域の遮蔽に関与していることも示されている<sup>12)</sup> ことから、この領域はウイルスの中和抗体から逃避に関与

する最も重要な領域の一つであると考えられる。広範囲な株を中和できる抗体を誘導するためには、この領域に対する抗体の誘導を避け、むしろこの遮蔽に影響されない抗体を誘導する必要がある。

#### (4) 抗 V3 領域抗体

V2 領域同様、V3 領域のアミノ酸配列は変化に富んでいる。この領域に対するマウスのハイブリドーマから作った抗体は、強力な中和活性を示すが、ウイルス株特異的な抗体が多い。これは直鎖状の V3 ペプチドを免疫したため、決まったアミノ酸配列しか認識できない抗体が選択されたためと考えられる。その一方、HIV 感染者から分離された抗 V3 単クローン抗体の中には、強力かつ広範囲の株を中和できる中和抗体がある。その抗体の一つに 447-52D という抗体がある。この抗体は、V3 tip 領域のアミノ酸配列を認識し、サブタイプ B の約 50% の株を中和できる。このような抗体が、何故株間で多様なアミノ酸配列をもつ V3 領域を認識し中和できるのであろうか？ その答えの鍵の一つが、V3 領域の立体構造である。V3 領域はアミノ酸変化に富んでいるが、V2 領域と違い、その長さはほぼ一定している (30-35 アミノ酸)。また、tip 付近の type II turn 構造はウイルス株間で保存されている。V3 領域は HIV が感染する際、ケモカインレセプターと相互作用に重要な領域であり、除去すると感染性を失う。また NMR を使った解析から、V3 領域はケモカインの一部と酷似していることが示されており<sup>13)</sup>、X4 ウイルスの V3 領域を、CXCR4 のリガンドである SDF-1 の一部と入れ替えても感染するという報告<sup>14)</sup> から、HIV は、V3 領域をケモカインレセプターのリガンドであるケモカインの一部に似せた可能性がある。つまり、HIV にとって V3 領域の立体構造を保つことは、感染性の維持に重要であると考えられる。このように、V3 領域の立体構造を認識できるような抗体を誘導することが、広範囲の HIV の中和につながる可能性がある。

#### (5) 抗 gp120 糖鎖抗体

gp120 の分子量の半分は、感染細胞内で付加される糖鎖で占められている。中和抗体の一つに、この糖鎖を認識して中和する抗体が存在する。感染者から分離された 2G12 という抗体は、実験室株のウイルスも、primary isolate も広く中和する。しかし、このような抗体を抗原の免疫によって誘導することは難しく、今のところ成功していない。また、この抗体が、感染のどの段階を阻害しているのか分かっていない。

#### (6) 抗 gp41 抗体

gp120 が CD4、ケモカインレセプターと結合した後、gp41 は大きく立体構造を変え、HIV 膜と標的細胞膜を貫通する。この分子に結合し、膜融合を阻害するのが抗 gp41 抗体である。代表的な抗体に 2F5 と 4E10 がある。驚くこと

に、これら二つの抗体は、サブタイプを超えた広範囲な中和能がある。このことから抗 gp41 抗体の誘導が、中和抗体誘導ワクチンとして最適だと考えられていた。しかし、これらの抗体のエピトープは、ウイルス膜表面に近い領域であり、ほとんどエンベロープ表面に露出しておらず、相当量の抗体濃度がないとウイルスを中和できない。また、これらの抗体のエピトープと同じアミノ酸配列をもつペプチドを免疫しても、中和能のある抗体は誘導されない。最近これら二つの抗体は、Cardiolipin という脂質の一種である自己抗原にも反応する多反応性自己抗体 (polyspecific autoantibody) であることがわかった<sup>7)</sup>。抗体の抗原結合部位である CDR3 の配列が長いことも自己抗体の性質に一致した。つまり先にも述べたとおり、このような抗体の誘導は難しいと考えられている。

### HIV 感染症における中和抗体の役割

急性感染期における中和抗体の役割は、十分には解明されていない。アカゲザルを用いたサル免疫不全ウイルス (Simian immunodeficiency virus : SIV) の感染実験では、急性感染期に B 細胞を除去しても、ウイルス量などに明らかな変化は見られなかった<sup>15)</sup>。しかし、亜急性期 (感染 4 週後以降) には、中和抗体活性と血中ウイルス量には逆相関がみられ、亜急性期においては中和抗体がウイルス量のコントロールに関与していると考えられる。

慢性感染期では、感染初期のウイルスに対する中和抗体が産生されるが、その中和抗体に対し、耐性を示す escape mutant が *in vivo* で出現する<sup>16)</sup>。また、慢性感染期に妊娠、出産した母子における垂直感染の有無と、母体の中和抗体の有無は有意な相関が見られる<sup>17)</sup>。これらのことは、中和抗体が、HIV に対して免疫学的な圧力をかけていることを示している。しかし、escape mutant に対応した中和抗体は、escape mutant が出現して数カ月しないと出現しないため、多くの感染者では、中和抗体はウイルスのコントロールに十分な役割を果たしているとはいえない<sup>16)</sup>。しかしその一方で、長期非進行者 (long term non-progressor : LTNP) の中には、広範なウイルスを中和できる強い中和抗体活性を持つ症例があることから<sup>18)</sup>、LTNP の中には、中和抗体がウイルス増殖のコントロールに関与している症例がある可能性がある。それらの人が保持している中和抗体が広範囲のウイルス株を中和できるのは、複数のエピトープに対する抗体が含まれているためなのか、または一つの抗体が、広範囲のウイルス株のエピトープを認識するためなのかは不明である。

### HIV の中和抗体からの逃避メカニズム

HIV は高頻度に変異を起こすウイルスである。そのた

め、その変異の早さから容易に免疫系から逃れることができる。特に Env は多様性に富んだ領域であり、HIV 全体ではアミノ酸配列が 50% 程度の相同性しかない。このことが HIV のワクチン開発を複雑にしている。しかし、ランダムに変異を入れているのではなく、標的細胞のレセプターと結合するための構造は維持しながら変異を蓄積させている。つまり、アミノ酸配列は変えるが、全体としての立体構造は大きく変化させないように変異していると考えられる。Env の立体構造を認識して中和する抗体が、広範囲の株を中和できるのはこのためであると考えられる。

その一方、HIV の中には中和抗体に対するエピトープは保存しているのにも関わらず、中和に抵抗性を示すウイルスが存在する。その原因の一つが、糖鎖によるエピトープの遮蔽である<sup>16)</sup>。ENV タンパクは、その分子量の約半分が糖鎖で占められている。Wei らは、自己の中和抗体に対し抵抗性となったウイルスのエンベロープには、糖鎖が多く付加されており、それが中和抗体の結合を阻害するということを報告した<sup>16)</sup>。その他の逃避メカニズムに、立体構造変化による中和エピトープの遮蔽がある。Wang らは、中和エピトープとしては機能しない C3 の変異がエンベロープの立体構造を変え、HIV が中和抗体から逃避していることを示した<sup>19)</sup>。中和逃避メカニズムについては、まだ不明な点が多い。この分野の研究が進み、変異に影響されない、または変異しても中和できるような抗体の誘導が期待される。

### HIV 感染症に対する治療・ワクチンとしての中和抗体

LTNP の一部では、広範囲なウイルスに対する中和抗体が存在すること<sup>18)</sup>や、チンパンジーやサルによる感染実験では、中和抗体の投与により SIV の感染を完全に阻止できる<sup>20,21)</sup> ことなどから、中和抗体の誘導は、HIV 感染症に対するワクチンの一つとして注目されている。しかし、HIV は多様性に富むウイルスであるため、単一のペプチドなどを抗原とすると、多くの場合、限られたウイルス株しか中和できない抗体が誘導される。gp120 そのものを免疫した場合でも、効果的な中和抗体の誘導には不十分と考えられている。

いくつかのウイルス株に対しては、強い中和活性を示す抗 HIV 単クローンを複数同時に使用した場合、相加効果のみならず相乗効果が得られ、広範囲なウイルスに対して感染防御を行い得ることが示された<sup>22)</sup>。このことから、現在のワクチンプロトコールは、HIV の多様性に対応できるよう、様々なエピトープを認識する複数の中和抗体の誘導を目的としているものが多い。この誘導方法のひとつに、gp120 と gp41 のエピトープをタンデムに連結した抗原を免疫した報告がある<sup>23)</sup>。これにより、Env の複数の部位に

対する抗体を同時に誘導することができた。また他のグループでは、gp120 の V2 loop や糖鎖が中和エピトープを遮蔽していることに着目し、これらを除去し、中和エピトープを露出させるよう改変した Env を抗原として使用することが試みられている<sup>24)</sup>。

抗原の立体構造を認識する抗体の方が、ペプチドを免疫して誘導された抗体より広範囲のウイルス株を中和できることなどから、gp120 の V3 領域を認識し、広範囲のウイルス株を中和する抗体に結合する立体構造抗原（ミモトープ）を免疫する試みも行われている。ファージを使った方法によりスクリーニングし、選択したミモトープを rabbit に免疫した結果、HIV のいくつかの株に対し交差反応する抗体が誘導できた<sup>25)</sup>。

このように、現在まで様々なワクチン開発が行われており、有効な免疫の誘導が行える可能性が示されつつあるが、実用化に至るような成果は得られていない。現在も、効果的な抗体を誘導できるような免疫原の開発が続けられている。変異に富む HIV に対する免疫応答を維持するためには、免疫原の探索だけではなく、HIV 特異的 CD4 陽性細胞の存在も重要であると考えられる。しかし HIV は、HIV 特異的 CD4 陽性細胞に優先的に感染し、その数を減少させることが示されており<sup>26)</sup>、治療ワクチンとして考えた場合、有効な免疫を誘導するだけではなく、それを維持する方法をも考慮する必要があると思われる。

### 文 献

- 1) Zwick MB *et al* : Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75, 10892-10905, 2001.
- 2) Dimmock NJ : Neutralization of animal viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 183 : 1-149, 1993.
- 3) Tyler DS *et al* : Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *J Immunol* 145 : 3276-3282, 1990.
- 4) Koup RA *et al* : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed by a human monoclonal antibody reactive with gp120 of HIV-1. *AIDS* 5 : 1309-1314, 1991.
- 5) Kwong PD *et al* : Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 74 : 1961-1972, 2000.
- 6) Kessler JA *et al* : Recombinant human monoclonal antibody IgGb12 neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13 : 575-582, 1997.

- 7) Haynes BF *et al* : Cardioliipoin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308 : 1906–1908, 2005.
- 8) Hioe CE *et al* : Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 gp120 presentation to CD4 T cells by antibodies specific for the CD4 binding domain of gp120. *J Virol* 75 : 10950–10957, 2001.
- 9) Decker JM *et al* : Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J Exp Med* 201 : 1407–1419, 2005.
- 10) Labrijn AF *et al* : Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77 : 10557–10565, 2003.
- 11) Cao J *et al* : Replication and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 lacking the V1 and V2 variable loops of the gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 71 : 9808–9812, 1997.
- 12) Pinter A *et al* : 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, 2004.
- 13) Sharon M *et al* : Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic  $\beta$  hairpin in chemokines, suggestion a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure* 11 : 225–236, 2003.
- 14) Yonezawa A *et al* : Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75 : 4258–4276, 2001.
- 15) Schmitz JE *et al* : Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol* 77 : 2165–2173, 2003.
- 16) Wei X *et al* : Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422 : 307–312, 2003.
- 17) Scarlatti G *et al* : Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunol Lett* 51 : 23–28, 1996.
- 18) Pilgrim AK *et al* : Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 176 : 924–932, 1997.
- 19) Wang FX *et al* : 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, 2002.
- 20) Shibata R *et al* : Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* 5 : 204–210, 1999.
- 21) Emini EA *et al* : Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* 355 : 728–730, 1992.
- 22) Zwick MB *et al* : Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* 75 : 12198–12208, 2001.
- 23) Li H *et al* : Recombinant multi-envelope vaccine induce predefined epitope-specific antibodies against HIV-1. *Immunol Lett* 84 : 153–157, 2002.
- 24) Barnett SW *et al* : The ability of an oligomeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope antigen to elicit neutralizing antibodies against primary HIV-1 isolates is improved following partial deletion of the second hypervariable region. *J Virol* 75 : 5526–5540, 2001.
- 25) Keller PM *et al* : Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* 193 : 709–716, 1993.
- 26) Douek D *et al* : HIV preferentially infects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* 417 : 95–98, 2002.