

中和活性ある抗HTLV-I env 単クローン抗体

戸沢秀樹¹, 田中勇悦¹, Lee Zeng¹, 志田壽利², 白木 洋³

要約: HTLV-I env 遺伝子を発現する組み換えワクシニアウイルスで免疫したラット(WKA/H 系統)の脾細胞を用いたハイブリドーマ法によりgp46の種々のエピートプと反応するIgG型単クローン抗体群を作製した。その中でLAT-27抗体はHTLV-Iの細胞融合能を阻止した。合成オリゴペプチド(10 mer)を抗原としたELISAで LAT-27は gp46アミノ酸 191-196 を特異的に認識することが示唆された。卵白アルブミンに結合させた合成オリゴペプチド, gp46アミノ酸 190-199, で免疫したウサギには HTLV-I感染中和活性のある抗gp46抗体が誘導された。

見出し語: HTLV-I, 感染中和, 単クローン抗体

研究方法: (1) 単クローン抗体の作製: WKA/H 系統ラットをHTLV-I env 遺伝子を発現する組み換えワクシニアウイルスWR-proenv 1を感染(m.o.i.10, 16hr)させた同系腎細胞で免疫した。このラット脾臓細胞とSp2/0とを融合しハイブリドーマを分離した。蛍光抗体法及びウエスタンブロット法で抗env抗体をスクリーニングし単クローン抗体を樹立した。ウエスタンブロット法には, WR-proenv 1またはHTLV-IpXを発現するWR-27xを感染したHeLa細胞や MT-2細胞などの可溶化抗原を用いた。(2) 感染中和試験: 抗体存在下でHTLV-I感染細胞(ILT-MOR-II)とMolt-4細胞とを混合培養し, 16時間後に融合細胞の出現の阻止で判定した。(3) ELISA: POD標識抗

ラットIgGを用いる間接法を用いた。(4) ペプチド免疫: キャリアー(卵白アルブミン, OVA)にgp46アミノ酸190-199を共有結合させFCAエマルジョンの状態で, NZWウサギに2週間ごと4回筋注した。

結果: (1) 5種類のオリゴペプチドを用いたELISAで, 今回得られた抗体は6群に分類され, その中でペプチド175-199と反応する一群, group III, はHTLV-Iの感染性を阻止した(表1)。

(2) group III, II, Vより代表する単クローン抗体LAT-27, LAT-12, LAT-25 (どの抗体もラットIgG型)を選択し, それぞれの反応性を検討した。どの抗体もgp46抗原と反応した(図1)。蛍光抗体法ではいずれ

¹北里大.衛生.免疫(Dept. of Immunol., Sch. Hyg. Sci., Kitasato Univ.), ²京大.ウイルス研(Institute for Virus

Research, Kyoto Univ.), ³福岡県赤十字血液センター(Fukuoka Red Cross Blood Cener)

表1: 作製された単クローン抗体の反応性

Group	Reactivity with gp46 synthetic peptide ^a					HTLV-I neutralization ^b	Total number of mAb
	20-49	89-115	175-199	253-282	288-317		
I	-	+	-	-	-	-	3
II	-	-	+	-	-	-	7
III	-	-	+	-	-	+	18
IV	-	-	-	+	-	-	3
V	-	-	-	-	+	-	10
VI	-	-	-	-	-	-	17

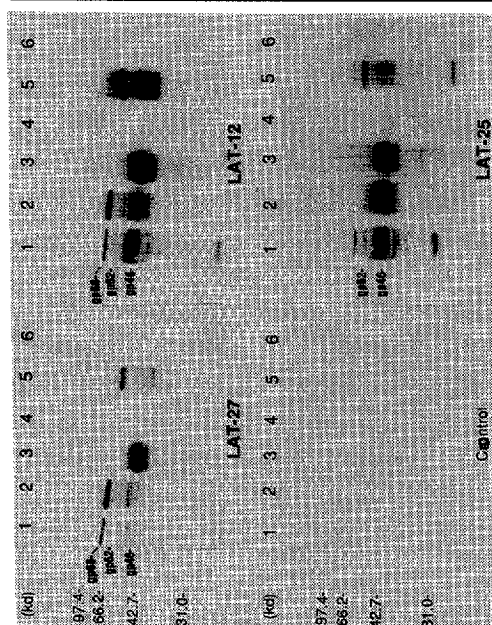


図1: 単クローン抗体のgp46抗原との反応性(ウエスタンブロット):

各レーンは、(1)MT-2 cell lysates; (2) (1)の糖蛋白分画, (3)MT-2 cell培養上清の糖蛋白分画; (4)-(6)はそれぞれ control ワクシニア(4), WR-proenv1(5), WR-27x(6)-感染HeLa cell lysates。

もHTLV-I産生細胞の表面を特異的に染色した。図2は、LAT-27のみがHTLV-Iの感染性を中和することを示す。LAT-27の中和に必要な最低抗体濃度は2.5ug/mlであった。またLAT-27は10ug/mlでHTLV-Iによる正常PBLのトランスフォーメーションを阻止した。

ELISAで調べた。細胞融合阻止反応で調べた。

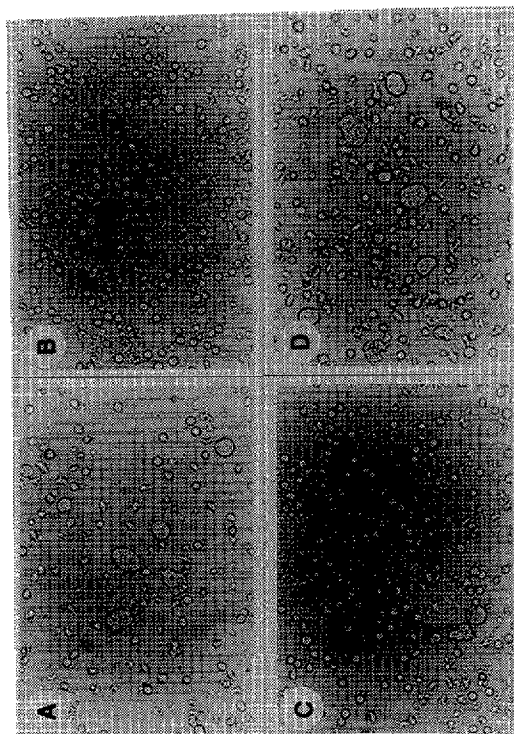


図2: LAT-27によるHTLV-I細胞融合能阻止

ILT-MOR-IIとMolt-4細胞を各単クローン抗体(100ug/ml)の存在下で16時間混合培養した。(A)培地のみ, (B)LAT-27, (C)LAT-12, (D)LAT-25。

(3) 抗体結合競合試験でHTLV-Iキャリアの血清はLAT-27, LAT-12, LAT-25のgp46抗原への結合を特異的に阻止した。

(4) LAT-27 認識エピトープをオーバーラップする合成オリゴペプチドを用いて

同定した(10merずつ165-209の範囲で)。
表2は、LAT-27のエピトープには、アミノ酸配列< Leu-Pro-His-Ser-Asn-Leu>が不可欠であることを示す。LAT-12はどの10merペプチドとも反応しなかった。LAT-27(5ug/ml)を予めペプチド190-199やペプチド175-199(最低濃度は0.2ug/ml)と反応させておくと、LAT-27の中和活性が阻止された。ペプチド195-201や 288-317ではこのような阻止は見られなかった。
(5) ウサギをOVAと結合したペプチド190-199で免疫するとHTLV-I 中和活性のあるgp46に対する抗体が誘導された(表3)。

表2: LAT-27とLAT-12と種々の合成ペプチドとの反応

gp46 peptide	Binding of mAb (OD492)		
	PBS	LAT-27	LAT-12
175-199	0.03	>2.00	>2.00
165-174	0.06	0.06	0.05
170-179	0.06	0.06	0.06
175-184	0.05	0.06	0.05
180-189	0.06	0.06	0.06
185-194	0.05	0.05	0.05
190-199	0.06	0.74	0.05
195-204	0.05	0.04	0.04
200-209	0.05	0.05	0.04
186-195	0.06	0.06	0.04
187-196	0.05	1.75	0.03
188-197	0.03	>2.00	0.03
189-198	0.06	1.35	0.03
190-199	0.06	0.74	0.05
191-200	0.05	0.97	0.03
192-201	0.05	0.04	0.04
193-202	0.05	0.04	0.05
194-203	0.03	0.04	0.03

表3: gp46ペプチドで免疫したウサギ血清の反応性

Serum from	Immunized with	Antibody titer against ^a		HTLV-I neutralizing titer ^b
		peptide 190-199	OVA	
R-1	peptide 190-199	160	10,240	8
R-2	peptide 190-199	160	20,480	16
R-3	peptide 190-199	160	20,480	8
R-4	peptide 190-199	320	10,240	32
R-5	OVA alone	<10	40,960	<2
R-6	OVA alone	<10	20,480	<2

^a ELISAで調べた。

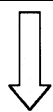
^b 細胞融合阻止反応で調べた。

考察: HTLV-I感染中和抗体LAT-27の反応性の解析により、HTLV-Igp46がウイルス感染に直接的な機能をする、及びgp46抗原分子上でアミノ酸191-196で構成される領域が一つのHTLV-I感染中和部位であることが分かった。

更に、今回作製された単クローン抗体群の反応性からgp46抗原には少なくとも5種類の中和非関連エピトープが存在することも分かった。これらの非中和単クローン抗体群を様々に混合しても、感染中和活性は検出されないことから、LAT-27による感染中和は抗体によるgp46の立体的障害よりもむしろ抗体がgp46の機能部位に結合することによる直接機能障害を介して行なわれる可能性がある。

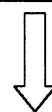
中和活性のあるHTLV-I感染者由来のIgGに予めgp46ペプチド190-199やペプチド175-199を反応させてもその中和活性は阻止されないことから、ヒト抗体の認識する感染中和エピトープはgp46のアミノ酸175-199以外にも存在する可能性がある。gp46アミノ酸191-196を含む合成ペプチド190-199で免疫したウサギの血清には中和活性のある抗gp46抗体が検出できたことから、このペプチドは中和抗体の誘導を目的とするワクチンとして利用できる可能性を持つ。今後gp46アミノ酸191-196を骨格として様々な長さの合成ペプチドを作り最も免疫原性の高い構造を決定する予定である。また現在、gp46アミノ酸191-

196以外のHTLV-I感染中和エピトープを探している。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約：HTLV-I env 遺伝子を発現する組み換えワクシニアウイルスで免疫したラット(WKA/H 系統)の脾細胞を用いたハイブリドーマ法により gp46 の種々のエピトープと反応する IgG 型単クローン抗体群を作製した。その中で LAT-27 抗体は HTLV-1 の細胞融合能を阻止した。合成オリゴペプチド(10mer)を抗原とした ELISA で LAT-27 は gp46 アミノ酸 191-196 を特異的に認識することが示唆された。卵白アルブミンに結合させた合成オリゴペプチド, gp46 アミノ酸 190-199, で免疫したウサギには HTLV-1 感染中和活性のある抗 gp46 抗体が誘導された。