

令和元年9月30日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19167

研究課題名(和文) インフルエンザ感染モデルにおける交差防御抗体の産生機序の解明

研究課題名(英文) Cross-protective antibody responses against influenza virus infection

研究代表者

安達 悠 (Adachi, Yu)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：40749016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に、インフルエンザウイルス複製部位である肺組織の胚中心において、交差反応性B細胞が高頻度で選択されていることを明らかとした。本研究において我々は、この交差反応性B細胞が認識するヘマグルチニン(HA)のステム領域に隠れた抗原部位を特定した。さらに、この抗原部位は通常の三量体HA構造では隠れている一方、ウイルス複製時の酸性条件下において生じる膜融合型HA抗原構造で露出することを明らかとした。さらに、この膜融合型HAを免疫することで交差防御抗体の誘導が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した交差防御抗体は、ヒト記憶B細胞にも存在することからユニバーサルワクチンの新たな標的抗体になると考えられる。さらに、この交差防御抗体を選択可能な構造改変型ワクチン剤形は、現行ワクチンから簡便に作製可能であり、新規ユニバーサルワクチン剤形となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously found that cross-reactive B cells were highly selected in lung germinal centers (GCs) following influenza virus infection. In this study, we identified that an occluded epitope in hemagglutinin (HA) stem region for lung cross-reactive GC B cells. This epitope is occluded in native trimeric HA structure, but is exposed in post-fusion HA structure to occur under low-pH during viral replication. Furthermore, immunization by post-fusion HA antigen induces a class of protective antibody which have broad specificity.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザ B細胞 交差防御抗体 インフルエンザワクチン 免疫学

1. 研究開始当初の背景

防御抗体はウイルス感染に対する有効な対抗手段である。しかしながら、インフルエンザウイルスは抗原変異によって防御抗体から容易に回避してしまう。そのため、現行ワクチンの単回接種では終生免疫を付与することができない。

近年、抗原変異ウイルス株に有効な交差防御抗体という新しいクラスの抗体が同定された。さらに分子構造学的解析から、ウイルス表面抗原ヘマグルチニン (hemagglutinin; HA) 抗原のステム領域に、変異が起こりづらい抗原の共通エピトープが見出された。しかしながら、HA 抗原上の共通エピトープは立体障害により隠れた領域に位置するため認識する交差防御抗体を誘導されづらい。そのため現在、共通エピトープに結合する交差防御抗体を誘導し、抗原変異に対応可能なユニバーサルワクチン開発が精力的に進められている。

我々は以前、インフルエンザウイルス感染後のウイルス複製部位である肺組織で形成される胚中心では、二次リンパ組織 (所属リンパ節や脾臓) で形成される胚中心と比較して、変異ウイルス株の HA 抗原にも結合可能な交差反応性 B 細胞が優位に選択されていることを解明した。

そこで本研究では、ユニバーサルワクチンデザイン戦略における科学的基盤の整備に向け、抗原構造に焦点を当て、ウイルス感染後の肺組織の胚中心における交差反応性 B 細胞の選択機序の解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) ウイルス感染後の肺組織の胚中心において選択されている交差反応性 B 細胞の抗原エピトープの同定。

(2) 交差反応性 B 細胞、特に上記 (1) にて同定した交差防御抗体レパトアを効率的に選択可能な HA 抗原構造の探索。

(3) 上記 (2) において見出した HA 抗原構造を免疫することで誘導される交差防御抗体応答の評価。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルスを経鼻感染させたマウスの肺組織の胚中心で選択される交差反応性 B 細胞が認識する抗原エピトープを網羅的に調べるため、ハイスループットな single-cell B 細胞培養システムを用いて解析を行った。

さらにマウスで特定した交差防御抗体レパトアの存在をヒトにおいて検証するために、ヒト末梢血中のメモリー B 細胞の single-cell B 細胞培養を行い、抗原エピトープを解析した。

また、特定した交差防御抗体レパトアの感染防御能をマウスにて検証した。

(2) 種々の HA 抗原構造に対する交差防御抗体および交差反応性 B 細胞の結合性を、ELISA およびフローサイトメトリーにて評価した。

(3) 交差防御抗体の結合性が向上した HA 抗原構造をマウスへ免疫し、誘導される交差防御抗体応答を解析した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルスを経鼻感染させたマウスの肺組織の交差反応性を示す胚中心 B 細胞を single-cell 培養システムを用いてモノクローナル化し、抗原エピトープ解析を行った。その結果、肺組織で選択される交差反応性 B 細胞の主要な抗原エピトープは、HA ステム領域の LAH (Long alpha helix) であることを特定した。

マウスより単離した LAH モノクローナル抗体を、マウスに投与した後ウイルス感染させ、感染防御効果を検証した。その結果、LAH 抗体は、A/H3N2 と A/H7N9 ウイルス感染に対して防御効果を示した。

交差防御抗体には、抗体 Fc 領域と抗体 Fc レセプターの相互作用により感染防御能を発揮するタイプの抗体が報告されている。そこで、LAH 抗体による感染防御における Fc 領域の依存度を検証するために、Fc レセプターとの親和性を弱化させるアミノ酸変異を有する N297A 型を作製した。通常 Fc 型と N297A 型 LAH 抗体の感染防御能を比較した結果、N297A 型の感染防御効果が、通常 Fc 型と比較して減少したことから、LAH 抗体は抗体 Fc 依存的な感染防御効果を示すことを明らかとした。

ヒトにおいても LAH 抗体レパトアが存在するか否かをフローサイトメトリーにて検証した。その結果、ヒト末梢血中のメモリー B 細胞においても LAH 抗体レパトアは存在していた。さらにヒト交差反応性メモリー B 細胞の single-cell 培養を行い、様々な株の HA 抗原に対する結合特性を調べた。その結果、広域な交差反応性 (H1/H3/H5/H7 HA に結合) を示すクローンの存在を明らかとした。

胚中心における B 細胞レパトアのクローン選択では、抗原エピトープへの B 細胞アクセスがひとつの重要な要素である。LAH はウイルス膜近傍の隠れた領域に位置し、B 細胞のアクセスが悪いと考えられる。すなわち、ウイルス複製部位である肺組織に存在する HA 抗原構造は、二次リンパ組織に存在する構造とは異なり、LAH エピトープへのアクセスが良い特殊な抗原構造をとっている可能性が考えられた。

(2) LAH 抗体・交差反応性 B 細胞の、三量体 HA 抗原 (ウイルス粒子上でとる通常構造) と単量体 HA 抗原に対する結合性を比較した結果、三量体 HA 抗原に対して低い結合性を示した。

一方、HA 抗原はウイルス複製時の宿主細胞エンドソームの酸性条件下において、隠れていた LAH を外へ突き出した“膜融合型 HA”へと構造変化することが以前より知られている。そこで、ワクチンに酸性処理を施し LAH 抗体・交差反応性 B 細胞の結合性を調べた結果、膜融合型 HA ワクチンは現行 HA ワクチンと比較して LAH 抗体・交差反応性 B 細胞の結合性が有意に向上していた。

(3) マウスに膜融合型 HA ワクチンを免疫し、交差反応性 B 細胞応答を評価した。その結果、膜融合型 HA ワクチン免疫により、交差反応性の胚中心 B 細胞応答が誘導されていた。そこで single-cell 培養を用いてこれら交差反応性の胚中心 B 細胞のエピトープ解析を行った結果、半数以上のクローンが LAH を認識していた。また、膜融合型 HA ワクチン免疫では、交差反応性メモリー B 細胞および血中 LAH 抗体の誘導が確認された。

現行 HA ワクチンもしくは膜融合型 HA ワクチンの免疫血清をナイーブマウスに移入し、ワクチン株とは抗原性の異なるウイルスで感染させた。その結果、膜融合型 HA ワクチンの免疫血清は、現行 HA ワクチンの免疫血清と比較して感染防御効果の有意な向上を示した。

本研究で見出した LAH 抗体は、ヒトメモリー B 細胞にも存在することからユニバーサルワクチンの新たな標的抗体になると考えられる。さらに、LAH 抗体を選択・誘導可能な膜融合型 HA ワクチンは、現行ワクチンから簡便に作製可能であり、新規ユニバーサルワクチン剤形となることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Yoshimasa Takahashi, Taishi Onodera, Yu Adachi, Manabu Ato. Adaptive B Cell Responses to Influenza Virus Infection in the Lung. *Viral Immunol.* 30(6); 431-37. 2017. 査読あり

Kosuke Miyauchi, Akiko Sugimoto-Ishige, Yasuyo Harada, Yu Adachi, Yoshiko Usami, Tomohiro Kaji, Kentaro Inoue, Hideki Hasegawa, Takashi Watanabe, Atsushi Hijikata, Satoshi Fukuyama, Tadashi Maemura, Mariko Okada-Hatakeyama, Osamu Ohara, Yoshihiro Kawaoka, Yoshimasa

Takahashi, Toshitada Takemori, Masato Kubo. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nat Immunol.* 17(12): 1447-1458. 2016. 査読あり

Ryo Shinnakasu, Takeshi Inoue, Kohei Kometani, Saya Moriyama, Yu Adachi, Manabu Nakayama, Yoshimasa Takahashi, Hidehiro Fukuyama, Takaharu Okada, Tomohiro Kurosaki. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol.* 17(7): 861-869. 2016. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

Yu Adachi, Arnone Nithichannon, Masayuki Kuraoka, Garnett Kelsoe, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. Influenza hemagglutinin epitopes emerging at viral replication sites promote the clonal selection and plasma cell development of broadly protective B cells. Keystone symposia, 2018

Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y., Regulation of antibody breadth to mutating viruses through distinct germinal center selection. Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2017

ADACHI Yu, ATO Manabu, TAKAHASHI Yoshimasa, Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 第 45 回日本免疫学会総会、2016

ADACHI Yu, ATO Manabu, TAKAHASHI Yoshimasa. Distinct germinal center selection at local sites shapes cross-protective memory B cell response to viral escape. 第 16 回国際免疫学会議, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: インフルエンザ HA スプリットワクチンの製造方法

発明者: 高橋宜聖、安達悠、阿戸学

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2017-169230

出願年: 2017

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

国立感染症研究所 免疫部 ホームページ
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-imm.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 悠 (YU ADACHI)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：40749016

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

()