

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06907

研究課題名(和文) N型糖鎖修飾の改変による広域抗ウイルス中和抗体誘導技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of broadly neutralizing antibody induction technology by modification of N-glycosylation

研究代表者

駒 貴明 (KOMA, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：00803496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではHIV-1 NL4-3株(CXCR4指向性、実験室株)を用いてMPER認識広域中和抗体(bNAbs)の結合を阻害するN型糖鎖修飾部位を明らかにした。またCCR5指向性HIV-1 5gtu株と臨床分離株由来エンベロープタンパク質(Env)をもつgtu-A4Y1株を用いた中和抗体感受性試験からV3-loop/V3-glycan認識bNAbsはN型糖鎖の影響を受けることを明らかにした。一方でV1-V2 loop認識bNAbsはN型糖鎖修飾の影響をあまり受けなかった。またHIV-1ワクチンを評価できるマウスモデルの開発を試み、ヒト白血球が生着し、T/B細胞へ分化するヒト化マウスを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、様々なHIV-1を中和する広域中和抗体はHIV-1 EnvのN型糖鎖修飾に影響を受けることを明らかにした。これによりN型糖鎖修飾の除去は広域中和抗体がより強く誘導されると推測され、今後のワクチン開発に役立つと考えられる。

HIV-1感染モデルとして超免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植したヒト化マウスが使われるが、獲得免疫が発動しないため、ワクチン評価に用いることが出来ない。本研究では獲得免疫を発動するヒト化マウスの改良も並行して行った。獲得免疫発動型ヒト化マウスを構築できれば、HIV-1だけでなく他の感染症や免疫、癌などの領域での応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we clarified using HIV-1 NL4-3 strain (CXCR4 tropism, laboratory strain) that N-glycosylation sites inhibit the binding of MPER-recognizing broadly neutralizing antibodies(bNAbs). It was revealed that V3-loop/V3-glycan-recognizing bNAbs are affected by N-linked glycosylations. On the other hand, V1-V2 loop recognition bNAbs was not so affected by N-linked glycosylations. To evaluate HIV-1 vaccines, we have developed a humanized mouse that has human leukocytes including T and B cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HIV-1 広域中和抗体 N型糖鎖修飾 ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

複製過程で高頻度に変異が起こるため、HIV-1 ワクチンの開発は難航している。この問題に対処するため、近年、様々な HIV-1 のエンベロープタンパク質 (Env) を認識し広くウイルスを中和する広域中和抗体 (bNAbs) の誘導が試みられている。しかしながら、bNAbs の特殊な性質のため、未だ有効なワクチン開発には至っていない。HIV-1 の bNAbs を含む中和抗体が誘導されにくい理由の一つは、Env に保存されている大量の N 型糖鎖修飾 (20~35 箇所) によるものであると考えられる。事実、HIV-1 89.6 株 Env のアミノ酸配列 197 番目に位置する N 型糖鎖は CD4bs をエピトープに持つ bNAbs や V3 ループをエピトープに持つ bNAbs の結合を抑制していることが報告されている。一方で、他の保存された N 型糖鎖修飾が、どこの領域を認識する bNAbs を結合抑制しているかは明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

bNAbs を強く誘導し、復帰変異を起こしにくい Env を設計するための基礎研究を行なう。またワクチン評価を行うための動物モデル開発を目的とする。

3. 研究の方法

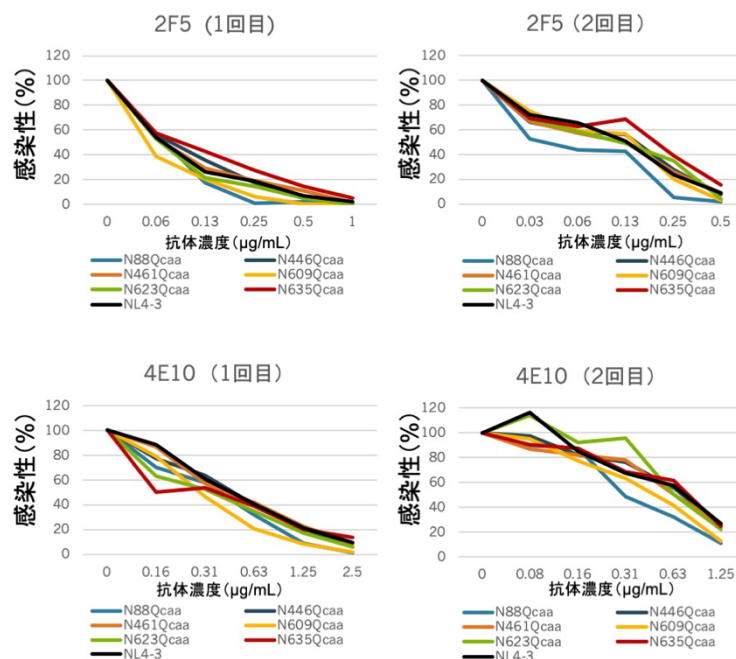
- (1) CXCR4 指向性の HIV-1 NL4-3 株 Env 上の N 型糖鎖修飾を欠損させた変異体を構築し、bNAbs、特に膜貫通部位近傍 (MPER) 認識抗体への感受性を調べた。
- (2) また CCR5 指向性 HIV-1 5gtu 株と臨床分離株由来 Env をもつ gtu-A4Y1 株を構築し V3-loop/V3-glycan 認識 bNAbs に対する感受性を調べた。
- (3) HIV-1 ワクチンを評価するためのマウスモデルの構築を目指して、超免疫不全マウス (NSG) にヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞を骨髓腔内移植した。

4. 研究成果

(1) MPER 認識 bNAbs 結合に影響を与える N 型糖鎖修飾部位を明らかにするために、MPER 近傍の N 型糖鎖修飾部位を一つずつ欠損させた変異体 (N88Qcaa、N446Qcaa、N461Qcaa、N609Qcaa、N623Qcaa、N635Qcaa) を構築した。MPER 認識 bNAbs (2F5 および 4E10) で中和試験を行なったところ、MPER 認識 bNAbs 結合に影響を与える N 型糖鎖修飾部位は N88、N609、N623 であることを明らかにした (図 1)。ただし、それらの N 型糖鎖修飾部位を一つを潰すだけでは、その効果が弱く、複数同時に欠損させる必要があると考えられた。

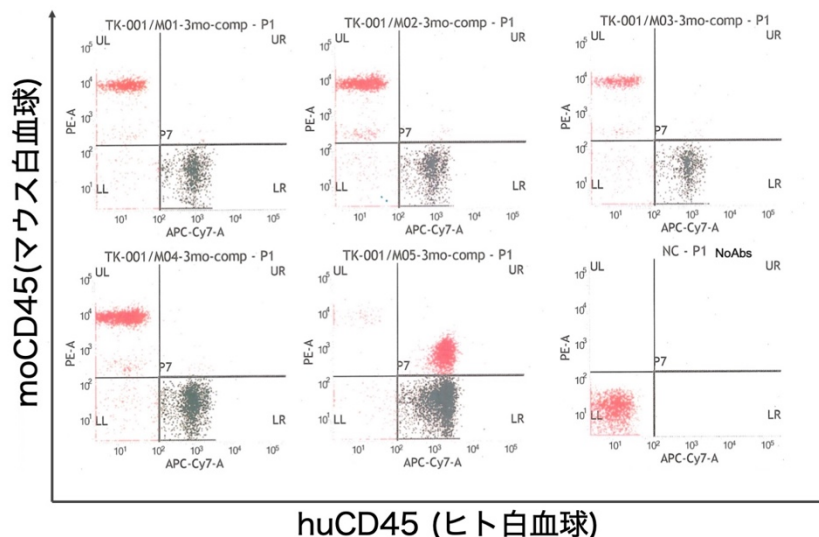
(2) CCR5 指向性の HIV-1 を用いて MPER 認識 bNAbs と V3-loop/V3-glycan 認識 bNAbs への感受性試験を行なった。試験に用いた HIV-1 5gtu 株は N 型糖鎖修飾可能部位数が 25 箇所であり、臨床分離株由来 Env をもつ HIV-1 gtu-A4Y1 株は N 型糖鎖修飾可能部位数が 33 箇所であった。そこで N 型糖鎖修飾部位数による bNAbs への感受性の違いをみたところ、N 型糖鎖修飾数が少ない 5gtu 株の方がそれらの中和抗体への感受性が顕著に高値を示した。

図1 MPER認識中和抗体感受性試験

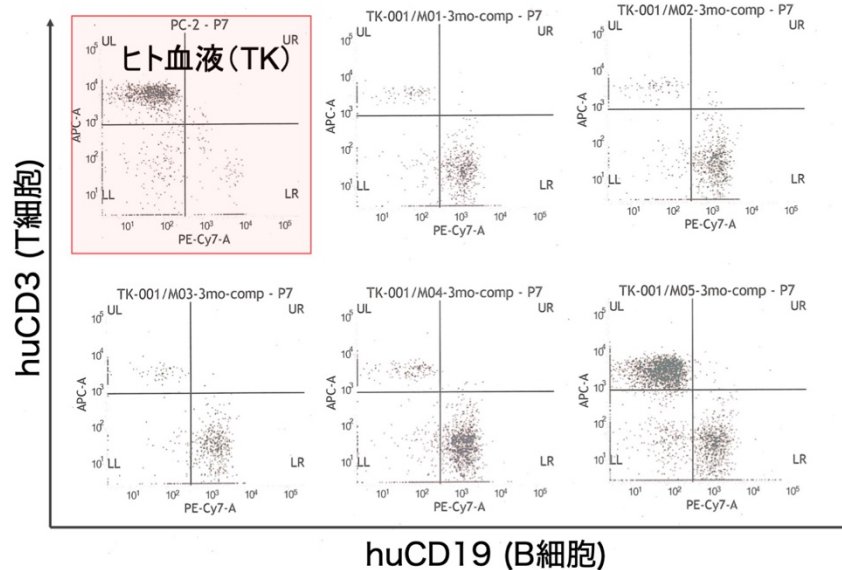


(3) 現在、ワクチンを評価するための適切な HIV-1 感染モデルが存在しないため、本研究ではヒト化マウスを用いて動物モデルの構築を行なった。ヒト化マウス作製に汎用される CD34 陽性造血幹細胞よりも、さらに未分化であるヒト臍帯血由来 CD133 陽性造血幹細胞を骨髓腔内移植することにより、ヒト白血球の生着および分化を促進させた。移植を行なったヒト化マウス体内では移植後 3 ヶ月でヒト白血球が生着しており、T 細胞や B 細胞への分化も認められた (図 2)。

図2 移植後84日目



移植後84日目



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Concomitant Enhancement of HIV-1 Replication Potential and Neutralization-Resistance in Concert With Three Adaptive Mutations in Env V1/C2/C4 Domains. Doi N, Yokoyama M, Koma T, Kotani O, Sato H, Adachi A, Nomaguchi M. Front Microbiol. 2019 Jan 17;10:2. doi: 10.3389/fmicb.2019.00002. 査読あり
- ② CXCR4⁻ and CCR5-Tropic HIV-1 Clones Are Both Tractable to Grow in Rhesus Macaques. Doi N, Miura T, Mori H, Sakawaki H, Koma T, Adachi A, Nomaguchi M. Front Microbiol. 2018 Oct 18;9:2510. doi: 10.3389/fmicb.2018.02510. 査読あり
- ③ HIV-1 mutates to adapt in fluxing environments. Nomaguchi M, Doi N, Koma T, Adachi A. Microbes Infect. 2018 Oct - Nov;20(9-10):610-614. doi: 10.1016/j.micinf.2017.08.003. 査読あり
- ④ Virological characterization of HIV-1 CA-NTD mutants constructed in a virus-lineage

reflected manner. Nakanishi S, Watanabe S, Doi N, Koma T, Adachi A, Nomaguchi M. J Med Invest. 2018;65(1.2):110-115. doi: 10.2152/jmi.65.110. 査読あり

- ⑤ Production of HIV-1 vif mRNA Is Modulated by Natural Nucleotide Variations and SLSA1 RNA Structure in SA1D2prox Genomic Region. Nomaguchi M, Doi N, Yoshida T, Koma T, Adachi S, Ode H, Iwatani Y, Yokoyama M, Sato H, Adachi A. Front Microbiol. 2017 Dec 18;8:2542. doi: 10.3389/fmicb.2017.02542 査読あり
- ⑥ Complete Genome Sequences of Human Immunodeficiency Type 1 Viruses Genetically Engineered To Be Tropic for Rhesus Macaques. Nomaguchi M, Doi N, Koma T, Adachi A. Genome Announc. 2017 Sep 28;5(39). pii: e01063-17. doi: 10.1128/genomeA.01063-17. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 野間口 雅子, 土肥 直哉, 駒 貴明, 吉田和子, 足立 昭夫 : SA1D2prox に関する HIV-1 Vif 低発現変異体 NL-gat は, Vif 発現量適応変異あるいは env 変異の獲得により増殖能を向上させる, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年 10 月.
- ② 足立 昭夫, 土肥 直哉, 駒 貴明, 大久保 隼人, 吉田和子, 野間口 雅子 : SA1D2prox 領域に関する HIV-1 Vif 超低発現変異体 NL-tac の APOBEC3G 高発現下における適応過程の解析, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年 10 月.
- ③ 駒 貴明, 小谷治, 土肥 直哉, 宮川敬, 梁明秀, 横山勝, 佐藤裕徳, 足立 昭夫, 野間口 雅子 : HIV-1 複製後期過程における Gag-CA リンカードメインの役割, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年 10 月.
- ④ 土肥 直哉, 駒 貴明, 中西 仁奈, 足立 昭夫, 野間口 雅子 : 馴化型 R5-tropic HIV-1rmt で同定された Env による増殖促進の解析, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年 10 月.
- ⑤ 中西 祥子, 渡邊 咲仁, 土肥 直哉, 駒 貴明, 足立 昭夫, 野間口 雅子 : HIV-1 Env V1/C4 domain 内の 1 アミノ酸変異は協調的に CD4 親和性を増加させ, ウイルス増殖を促進する, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年 10 月.
- ⑥ 渡邊 咲仁, 中西 祥子, 駒 貴明, 土肥 直哉, 足立 昭夫, 野間口 雅子 : HIV-1 SA1D2prox Vif 低発現変異体は複製抑制下で適応し Vif 発現を回復する, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年 10 月.
- ⑦ 土肥 直哉, 駒 貴明, 中西 祥子, 渡邊 咲仁, 野間口 雅子, 足立 昭夫 : Env domain swapping により増殖効率が向上した馴化型 R5-tropic HIV-1rmt の構築, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年 10 月.
- ⑧ 足立 昭夫, 土肥 直哉, 駒 貴明, 中西 祥子, 渡邊 咲仁, 野間口 雅子 : HIV-1 vif 産生量と SLSA1 の構造・エネルギー安定性の連関解析, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年 10 月.
- ⑨ 駒 貴明, 土肥 直哉, 宮川 敬, 梁 明秀, 足立 昭夫, 野間口 雅子 : HIV-1 複製後期過程における Gag-CA リンカー領域内アミノ酸残基 S149 及び I150 の役割, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年 10 月.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。