

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06032

研究課題名(和文) SIV感染サルを用いた強力な中和抗体を誘導するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism to induce potent neutralizing antibodies using SIV-infected macaques

研究代表者

桑田 岳夫 (Kuwata, Takeo)

熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特定事業教員

研究者番号：70346063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多様なSIV株を広範に中和する抗体B404に類似した抗体(B404類似抗体)誘導の解析を6頭のSIV感染アカゲザルを用いて行った。B404類似抗体の誘導は抗体重鎖遺伝子のVH3.33の多型と関連しており、VH3.33遺伝子の38番目がE、65番目がTのalleleを持ったサルだけがB404類似抗体を誘導した。SIVへの結合・中和活性には38Eが重要であった。これらの結果は、中和抗体の誘導が抗体遺伝子の多型によって決定されていることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多様なHIV-1株を広範に中和するbnAbの誘導が効果的なワクチンの開発に重要であると考えられるようになった。また、特定のbnAbを誘導するための抗原の開発も進んでいる。しかしながら、HIV-1感染によるbnAbの誘導は稀であり、そのメカニズムも不明である。本研究では、SIV感染サル・モデルを用いて中和抗体誘導の解析を行い、中和抗体の誘導と抗体遺伝子の多型が密接に関連していることを示した。この結果は、今後のワクチン開発に遺伝子多型を考慮する必要があることをあきらかにした。

研究成果の概要(英文)：Analysis of induction of B404-class antibodies, which neutralize various SIV strains, was performed using 6 SIV-infected macaques. Induction of B404-class antibodies was associated with polymorphism of immunoglobulin Heavy chain gene, and macaques with the VH3.33 allele with E at 38th position and T at 65th position induced B404-class antibodies. The 38E was important for binding to Env and neutralizing activity. These results suggest that induction of neutralizing antibodies is determined by polymorphism of immunoglobulin genes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：中和抗体 SIV 遺伝子多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 ワクチンは未だ開発段階であるが、タイで行われた HIV-1 ワクチンの臨床試験 RV144 で、初めてワクチンによる HIV-1 感染防御効果が確認され、感染防御効果における抗体の重要性があきらかとなった。また、サブタイプを超えた多くの HIV-1 株を広範に中和することのできる抗体 (broadly neutralizing antibody, bnAb) が HIV-1 感染患者から分離され、多様性に富んだ HIV-1 に対応可能な抗体が誘導できることが示された。RV144 の結果や bnAb の発見は、変異が多いため不可能であると考えられてきた抗体による HIV-1 の感染防御が可能であることを示しており、bnAb を誘導することが効果的な HIV-1 ワクチンを実現するための重要な課題となってきた。

bnAb は長い CDRH3 や多数の体細胞突然変異が特徴的であり、通常の抗体よりも誘導が難しい。その誘導メカニズムを解明するため、bnAb が分離された HIV-1 感染患者の解析が欧米の研究者を中心に精力的に行われている。しかしながら、bnAb の誘導が非常に稀である上、経時的な検体、特に感染初期の検体の入手が困難であるため、一部の HIV-1 感染患者でしか bnAb の成熟過程を解析できず、少数の解析例に留まっている。bnAb の誘導メカニズムをあきらかにするためには、より多くの解析例を用い、どのように bnAb が刺激されて成熟していくのか、どんな抗原が bnAb 誘導に必要なか、どのように免疫系がコントロールされれば bnAb が誘導されてくるのか、といった問題をあきらかにすることが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、広範な交差性のある bnAb の誘導メカニズムをあきらかにする。このために HIV-1 に近縁な SIV のマカク属サルへの実験感染系を用い、高頻度で誘導される bnAb である B404 類似抗体の誘導メカニズムを解析する。これまでの研究から、SIVsmH635FC 株を接種したサルでは B404 類似抗体が誘導されるが、他のウイルス株を接種したサルでは B404 類似抗体が誘導されないことが示唆されていた。bnAb の誘導が高頻度に見られる動物モデルは、このサル・モデル以外に報告されておらず、唯一の bnAb 解析モデルとなっている。bnAb の誘導過程の解明や、bnAb の成熟に影響するウイルス側の抗原変異や bnAb 誘導に必要な宿主要因を特定し、HIV-1 ワクチン開発に寄与する。また、本研究の成果は、抗体誘導を制御する新たなメカニズムをあきらかにするための基礎となり、従来は標的とならなかったエピトープへの抗体誘導法へと発展し、HIV-1 以外の感染症や他の疾患に応用されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) B404 類似抗体の誘導を解析するため、感染初期から感染 1 年後までの経時的なリンパ節検体から抗体のライブラリを構築し、ファージ・ディスプレイ法によって Env 特異的な抗体を分離した。分離した抗 SIV Env 抗体の様々な SIV 株への中和活性を測定し、交差中和活性を調べた。遺伝子配列を調べ、B404 類似抗体の特徴を持った抗体を特定した。

(2) 抗体誘導に影響する宿主因子の一つとして、B404 類似抗体が使用する VH3-33 遺伝子の遺伝的多型を調べた。各サルの持っている VH3-33 遺伝子 allele を同定し、B404 類似抗体との関連を解析した。

(3) Next Generation Sequencing (NGS) によって感染初期から感染 1 年後までの経時的な末梢血リンパ球とリンパ節の抗体遺伝子を解析して B404 類似抗体に近い配列を同定し、各 SIV 感染サルにおける B404 類似抗体の誘導を調べた。

(4) B404 抗体遺伝子を VH3.33 遺伝子 ET, VI allele の germline 配列に入れ替えた変異体を作成し、SIV Env への結合と中和活性を測定した。また点変異体を作成して、SIV Env への結合と中和活性に重要なアミノ酸残基を特定した。

4. 研究成果

(1) SIVsmH635FC 株を接種した 6 頭のうち、早期に発症した 1 頭を除く 5 頭から抗体のファージ・ライブラリを構築し、SIV Env に結合する抗体を分離した。SIV 感染サル#1980 は抗体応答が弱かったが、VH3.33 遺伝子を使用する B404 類似抗体が多数分離された (図 1)。他のサルからも中和抗体が分離されたが、B404 類似抗体とは異なる系統であった。

NAb titers of anti-Env Fab clones obtained from LNs by Bio-panning

animal wpi	clone	VH gene	CDR3	IC50 (µg/ml)				
				SIVsmH635FC	SIVsmE543-3	SIVmac316	SIVmac239	
#1964 51	618-51wK04	VH1.59	ATSYGSGIYSFGGGLDS	0.0019	0.0048	0.16	>8	
	618-51wL07	VH4.38	ARAPAYEDDYGYYYTLTSFDY	0.0019	0.0073	>8	>8	
	618-51wL09	VH4.22	ARSLFYFGNTYYTGEVWNSLDV	0.011	0.030	4.1	>8	
	618-51wL10	VH4.38	ARAPGYEDDFGFYYTLTSFDS	0.0026	0.013	0.074	>8	
	618-51wL16	VH4.38	ARAPGYEDDYGHYYTLTSFDY	0.0041	0.066	0.11	>8	
	55	618-55wK05	VH1.59	ATSYGSGIYSFGGGLDS	0.013	0.024	0.73	>8
618-55wK06		VH4.40	TRDQFDGSGSYFHY	0.0034	0.0037	0.0014	>8	
618-55wL01		VH4.38	ARAPGYEDDYGFYYTLTSFDY	0.0038	0.017	0.033	>8	
618-55wL03		VH4.57	ALGRSTSWEELLERFDV	0.0027	0.0082	0.84	>8	
618-55wL05		VH4.38	ARAPGYEDDYGHYYTLTSFDY	0.0067	0.034	0.28	>8	
618-55wL06		VH4.38	ARAPGYEDDYGFYYPLSSFDY	0.0044	0.016	0.071	>8	
#1994 51	617-51wK01	VH1.53	ARGDVMVSSPHLYGLDY	0.026	0.030	1.4	>8	
	617-51wK03	VH1.53	ARGDVLVSSPHLYGLDF	0.014	0.051	0.077	>8	
	617-51wK12	VH1.53	ARGDVLVSSPHLYGLDF	0.047	0.092	>8	>8	
	617-51wK15	VH1.53	ARGDVMVSSPHLYGLDY	0.013	0.012	0.11	>8	
	617-51wK18	VH1.53	ARGDVMVSSPHLYGLDY	0.059	0.051	2.5	>8	
	#1980 51	621-51wL02	VH3.33	VRGLSFDNFWNGDNEREQEYDF	0.013	0.0062	0.0022	>8
621-51wL03		VH3.33	VRGLSFDNFWNGDNEREQEYDF	0.18	0.015	0.29	>8	
621-51wL07		VH3.33	VRGLSFDNFWNGDNEREQEYDF	0.12	0.016	0.011	>8	
621-51wL08		VH3.33	VRGLSFDNFWNGDNEREQEYDF	0.048	0.015	0.0094	>8	
55		621-55wL01	VH3.33	TRGLSFDNFWNGDNEREQEYFEF	0.0095	0.012	0.0030	>8
		621-55wL04	VH3.33	TRGLSFDNFWNGDNEREQEYFEF	0.0093	0.018	0.0021	>8
		621-55wL06	VH3.33	TRGLSFDNFWNGDNEREQEYFEF	0.0083	0.011	0.0013	>8
		621-55wL07	VH3.33	TRGLSFDNFWNGDNEREQEYFEF	0.0044	0.020	0.0017	>8
#2008 51	622-51wK02	VH5.7	AKEGYRRFNWNREYFDL	0.31	>8	4.0	>8	
	622-51wL06	VH4.11	ATYSDSLEGALDV	0.093	0.010	0.015	>8	
	55 622-55wL02	VH5.7	AKDRWPSIEVNGGGGLNS	>8	>8	7.5	>8	

図1 分離された中和抗体の遺伝子と中和活性

(2)B404 類似抗体の誘導は、以前の研究では SIVsmH635FC 接種サル 4 頭全頭でみられたが、今回は#1980 以外のサルではみられなかったことから、宿主側に B404 類似抗体誘導の決定要因があることが示唆された。そこで、今回と前回の実験に使用した 10 頭のサルの B404 類似抗体が使用する抗体重鎖遺伝子の VH3.33 の塩基配列を解析した。その結果、VH3.33 遺伝子の 38 番目 (E/V)、65 番目 (T/I) が異なる ET, VI, VT の 3 つの allele を同定した (図 2 A)、B404 類似抗体が誘導されていた 5 頭のサルは全頭が ET allele を持っていたが、誘導されなかった 5 頭は全て VI allele のホモ接合体であった (図 2 B)。この結果は、B404 類似抗体の誘導が VH3.33 遺伝子の多型によって決定されていることを強く示唆した。

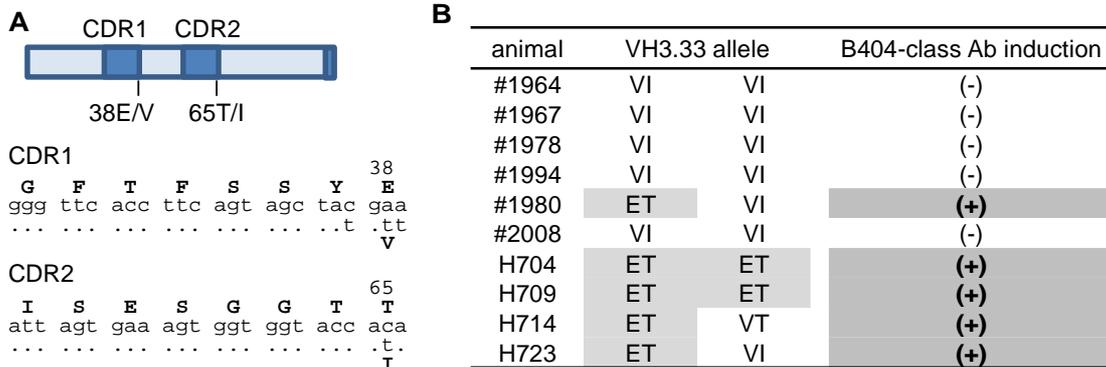


図2 B404 類似抗体が使用する VH3.33 遺伝子の多型と B404 類似抗体誘導

(3)NGS 解析によって、6 頭のサルの感染初期から感染 1 年後までの経時的な末梢血リンパ球とリンパ節を解析した結果、これまでに分離した B404 類似抗体とクラスターを形成する配列は B404 類似抗体が誘導された#1980 からしか得られなかった。また、VH3.33 ET allele を持つ#1980 では 38E, 65T を持った VH3.33 配列が多くみられたが、他の 5 頭のサルではほとんどみられなかった。この結果は、#1980 だけで B404 類似抗体が誘導されていることをあきらかにし、VH3.33 ET allele と B404 類似抗体誘導が関連していることを示唆した。

(4)VH3.33 遺伝子の多型が SIV Env への結合・中和活性に及ぼす影響をあきらかにするため、B404 抗体遺伝子を VH3.33 遺伝子の ET, VI の germline 配列に入れ替えた変異体を作成した。その結果、ET allele の配列に戻した B404 変異体は SIV への結合・中和活性を保持していたが、

VI allele の配列に戻した B404 変異体は SIV Env に結合せず、中和活性も無かった。一部を ET, VI の germline 配列に戻した B404 変異体の解析により、38V 変異によって Env への結合や中和活性が消失することがあきらかとなり、38E が bnAb B404 の誘導に重要であることが示された (図 3)。これらの結果は、VH3.33 遺伝子の多型が SIV Env への結合に大きく影響し、強力な中和抗体の誘導を決定していることを示した。抗体遺伝子多型は HIV-1 に対する bnAb の誘導にも影響すると考えられる。

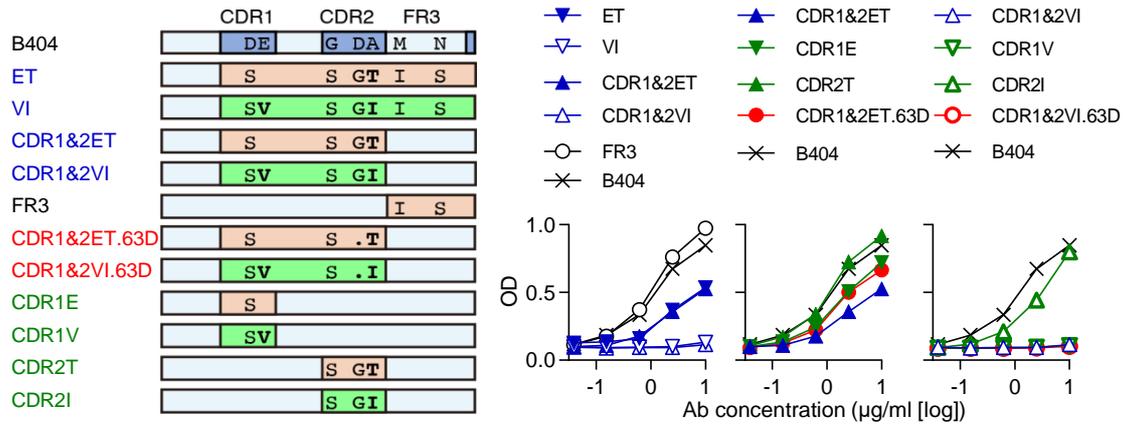


図 3 VH3.33 ET/VI allele の配列を持った B404 変異体の Env 結合活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Thida W, Kuwata T, Maeda Y, Yamashiro T, Tran GV, Nguyen KV, Takiguchi M, Gatanaga H, Tanaka K and Matsushita S	4. 巻 508
2. 論文標題 The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01_AE viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mamun MA, Kuwata T, Tanaka K, Alam M, Takahama S, Shimura K, Matsuoka M, Fukuda N, Morioka H, Tamamura H, Matsushita S	4. 巻 20
2. 論文標題 Synergistic inhibition of cell-to-cell HIV-1 infection by combinations of single chain variable fragments and fusion inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and biophysics reports	6. 最初と最後の頁 100687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.1006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Stanoeva KR, Konig A, Fukuda A, Kawanami Y, Kuwata T, Satou Y, Matsushita S	4. 巻 78
2. 論文標題 Total HIV-1 DNA Dynamics and Influencing Factors in Long-Term ART-Treated Japanese Adults: A Retrospective Longitudinal Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of acquired immune deficiency syndromes	6. 最初と最後の頁 239-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/QAI.0000000000001662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeda Yosuke, Takemura Taichiro, Chikata Takayuki, Kuwata Takeo, Terasawa Hiromi, Fujimoto Riito, Kuse Nozomi, Akahoshi Tomohiro, Murakoshi Hayato, Tran Giang Van, Zhang Yu, Pham Chau Ha, Pham Anh Hong Quynh, Monde Kazuaki, Sawa Tomohiro, Matsushita Shuzo, Nguyen Trung Vu, Nguyen Kinh Van, Hasebe Futoshi et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 Existence of Replication-Competent Minor Variants with Different Coreceptor Usage in Plasma from HIV-1-Infected Individuals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00193-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.00193-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaku Yu, Kuwata Takeo, Gorny Mirosław K., Matsushita Shuzo	4. 巻 73
2. 論文標題 Prediction of Contact Residues in Anti-HIV Neutralizing Antibody by Deep Learning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 235 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2019.496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayakawa Takuya, Tsuji Kohei, Konno Kiju, Himeno Ai, Masuda Ami, Yang Tingting, Takahashi Kohei, Ishida Yusuke, Ohashi Nami, Kuwata Takeo, Matsumoto Kaho, Yoshimura Kazuhisa, Sakawaki Hiromi, Miura Tomoyuki, Harada Shigeyoshi, Matsushita Shuzo, Tamamura Hirokazu	4. 巻 64
2. 論文標題 Hybrids of Small-Molecule CD4 Mimics with Polyethylene Glycol Units as HIV Entry Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1481 ~ 1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c01153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Saori, Kuwata Takeo, Ishii Hiroshi, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Sano Masato, Okazaki Midori, Yamamoto Hiroyuki, Shimizu Mikiko, Matsushita Shuzo, Seki Yohei, Saito Akatsuki, Sakawaki Hiromi, Hirsch Vanessa M., Miura Tomoyuki, Akari Hirofumi, Matano Tetsuro	4. 巻 95
2. 論文標題 A Potent Anti-Simian Immunodeficiency Virus Neutralizing Antibody Induction Associated with a Germ Line Immunoglobulin Gene Polymorphism in Rhesus Macaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02455-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02455-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kuwata T
2. 発表標題 Polymorphism of Immunoglobulin germline gene restricts induction of bnAbs against SIV
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Thida W, Kuwata T, Maeda Y, Tran G V, Nguyen K V, Takiguchi M, Gatanaga H and Matsushita S
2. 発表標題 Role of Conventional Antibodies in Control of HIV-1 CRF01_AE viruses
3. 学会等名 HIV Research for Prevention 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑田岳夫、Kaung Htet Lin、蜂谷敦子、Win Thida、中田浩智、岩谷靖雅、吉村和久、松下修三
2. 発表標題 抗HIV治療薬ドルテグラビル、マラビロクを含むcART中に出現した耐性ウイルスの解析
3. 学会等名 第28回抗ウイルス療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lin K H, Kuwata T, Thida W, Shimizu M and Matsushita S
2. 発表標題 Analysis of the envelope gene in the patient treated with maraviroc
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mamun M A, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Thida W, Takahama S, Kuwata T and Matsushita S
2. 発表標題 Synergistic inhibition by single chain fragment variables and fusion inhibitors in both cell-free and cell-associated HIV-1 infections
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郭悠、桑田岳夫、田中和樹、Biswas Shashwata、Zahid MD Hassan、松下修三
2. 発表標題 抗イディオタイプ抗体による抗V3中和単クローン抗体産生B細胞単離方法の検討
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗HIV抗体の製造方法	発明者 松下修三；桑田岳夫； 清水 衛；富田正浩； 道下真弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-203114	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関