

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07157

研究課題名(和文)サル免疫不全ウイルス中和抗体誘導における単一B細胞の動態解析

研究課題名(英文)Single-B-cell dynamics analysis in simian immunodeficiency virus-specific neutralizing antibody induction

研究代表者

山本 浩之(Yamamoto, Hiroyuki)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・グループ長

研究者番号：80574615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルエイズモデルにおいて、通常誘導しにくいウイルス特異的中和抗体を高度に誘導する動物のグループを見出し、ウイルス特異的中和抗体の体内における動態の精確な評価を、動物群の比較解析を通して試みた。結果、BCR等の遺伝子解析ベースの手法は単一B細胞の寄与度の推定に偏りが生じ得る可能性が示唆された。反対に、各Env変異株に対する中和能のスペクトルと特異的B細胞応答の対応関係を評価することが最も明瞭なアプローチであり、抗ウイルスB細胞動態をトータルとして機能的に把握可能であることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、サルエイズモデル中における稀少な動物の亜群を出発点として、サル免疫不全ウイルスに対する抗体の有効性、特にウイルスを中和する抗体(中和抗体)の意義を評価する方法を検索した。当初想定していた遺伝子解析ベースの手法と異なり、血漿検体ベースの実験手法でウイルス学的に解析し、さらに細胞ベースの解析結果と照合するほうがより正確に生体内の抗体応答の動態を評価できる可能性を見出した。この結果は、社会的な重要課題である、今後のウイルス制御戦略に対して必須の基礎的知見を与える結果である。

研究成果の概要(英文)：A group of animals were identified in a rhesus macaque AIDS model which induce simian immunodeficiency virus-specific neutralizing antibody responses. Neutralizing antibody dynamics in vivo were scrutinized in these animals, in comparison with a control group. In result, B cell receptor-based approaches were implied to evoke skewing of estimating single-B-cell contributions in vivo via population isolation bias. In contrast, defining the spectrum of Env mutants and its correlation with specific B-cell responses appeared more clear, depicting a more holistic image of antiviral B-cell dynamics.

研究分野：ウイルス感染免疫学

キーワード：HIV SIV 中和抗体 B細胞 Env

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エイズウイルス [ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイルス (SIV)] は、活性化 CD4 陽性 T 細胞を標的とし、高度の中和抗体 (NAb) 誘導不全をともなった持続感染を引き起こす。逆に、SIV 感染サルモデルで感染急性期に NAb を受動免疫すると、T 細胞誘導の亢進という機序を介し持続的かつ強力なウイルス制御が生ずることを筆者は近年解明した (Yamamoto H et al., AIDS 2016; Iseda S et al. & Yamamoto H, J Virol 2016 他)。この知見は、「持続感染成立に NAb の欠如が決定的に寄与している」とともに、「適切なタイミングで誘導された NAb は、T 細胞との相乗的な防御機構も HIV に対し発揮できる」可能性を意味し、きわめて重要である。この知見に引き続き、HIV/SIV 特異的 NAb 誘導不全の機序を解明することは、新規ウイルス制御戦略に直結する要のステップとなる。

HIV/SIV 感染に対する宿主の中和抗体応答は、「急性期に遮断され、慢性期の誘導も難しく、誘導される場合の個体差も激しい」という経過をたどるが、筆者は継続的なスクリーニングにより、高度抗体抵抗性の SIV 株 (SIVmac239) に対しても NAb を誘導したサル群を見出した。これを立脚点とした本研究の核心となる問いは、「SIV 特異的 NAb の誘導に成功したサル群においては、ウイルス特異的 B 細胞の応答が『量』、『質』の両面から最適化されたのではないか」ということである。

### 2. 研究の目的

エイズウイルスなどの持続感染ウイルスの大きな特徴は、NAb に対する抵抗性を示すことである。この性質は、標的であるエンベロープ (Env) の低抗原性やウイルスの免疫シグナル攪乱など様々な機構の組合せで生ずる。このような持続感染ウイルスに対して NAb 誘導を目指す場合、「良い中和抗体応答」と「不十分な結合抗体応答」を比較し、それらにつきウイルス特異的 B 細胞の「量」(何種類の領域を標的とするか) 及び/または「質」(各標的につきどの程度の変異蓄積/構造変化が必要か) の差を解明してゆくことが、B 細胞応答をデザインするための手段として必須となる。筆者は近年、最も抗体抵抗性が高い SIV に対しても中和抗体を強く誘導できるサル群を特定した (報告中)。本研究はこの新規モデルを活用し、Env 特異的 B 細胞の分化状態、ウイルス経時逃避、Env 特異的 B 細胞の B 細胞受容体 (BCR) クローナリティの 3 つの解析を必要に応じて組合せた単一 B 細胞レベルでの動態解析を行い、抗ウイルス NAb 応答を深く理解することを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) SIV 中和抗体誘導における Env 特異的 B 細胞の分化状態の解析: SIV 感染における Env 特異的 B 細胞応答を精確に描出できる条件を同定し、分化解析を期した。

Env 特異的形質芽球 (PB) の染色パネル確立:

フローサイトメーターを用いて Env 特異的 PB 集団の精確なゲーティングを確立した。そのために、サル免疫細胞の精確な定義 (NK・pro-B 細胞の除外) B 細胞終分化をよく反映した分子発現パネルの作成 (転写因子発現など) SIV Env 特異的 IgG 陽性集団の特異度の高い標識 (2 重染色の最適化) を重視した。後述の BCR 予備解析などを鑑みつつ本ステップを段階改良した。

NAb 誘導群における PB vs メモリー B 細胞 (Bmem) 誘導パターンの解析: NAb 誘導サル群と対照サル群で、PB・Bmem 応答レベル、特にその経時的な偏移の有無を 2 次元的に解析した。

(2) SIV 中和抗体に対するウイルスエスケープのパターン評価: NAb エスケープ Env 変異体ウイルスのパネルを作製し、サル血漿によるウイルス中和の経時解析を行うことで B 細胞応答速度の同定を行った。

Env 特異的抗体エスケープ変異体 SIV の作製: Env 可変領域 1~5 (V1-V5) の各領域に、事前の Env 配列解析からエスケープ変異と推測された点変異を有する SIV、及びその組み合わせを有する Env 変異 SIV を作製した。

NAb 誘導群と非誘導群における中和エスケープのパターンの比較解析: 当該サル群の血漿につき、上記の変異 SIV パネルに対する中和活性を測定し、エスケープの速度・程度及び「抗体エスケープウイルスがどの程度新たに中和されるか」を解析し、B 細胞応答の有効性を描出した。ウイルス中和試験には特異度の高い killing assay を用いた。

(3) SIV Env 特異的 B 細胞応答における B 細胞受容体 (BCR) クローナリティ解析: Env 特異的 B 細胞集団のフローサイトメーターによるソーティングを行い、全集団の BCR の cDNA ライブラリを作製し、使用 IgG 重鎖 (IGHV) の系統解析を行った。

BCR 重鎖 cDNA ライブラリの作製:

FACS Aria ソーターを用い Env 特異的 B 細胞集団ソーティングを行い、全集団と単細胞ソーティング経路で mRNA を抽出した。Bmem をソート対象として優先し、PB の比較も試みた。

サンガー法及び次世代シーケンサーによる BCR 使用偏移の系統解析:

作製 cDNA につき 3' IgG 定常域プライマー、及び作製済みの 5' マルチプレックスプライマーで重鎖、鎖、軽鎖の 3 領域につき nested PCR を行った。SMARTer 処理由来 cDNA については IGHV を解析対象に絞り、Illumina 社 MiSeq を用いてアンプリコンを系統解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Env 変異ウイルスパネルの作製に基づく SIV 中和スペクトルの解析

SIV 感染、またウイルス特異的中和抗体誘導時における単一 B 細胞の動態解析を精確に行うことを目標に、まず Env 可変領域変異 SIVmac239 (20 種類) の作製を完了した。これらを標的ウイルスとして用いたウイルスキリング型のパネル中和アッセイを SIVmac239 感染サル (中和抗体誘導、非誘導) の各数頭につき行い、それによりウイルス中和の標的特異性を検討した。途中、ウイルスの由来細胞によりアッセイの検出域が変化することを把握したのを踏まえ、アッセイ系の改良を行った。結果、Env V1, V4 領域に対する Env 変異は調べた全頭につき中和抗体エスケープ変異体であることが見出された。これに対し、V2, V5 領域 Env 変異体は中和エスケープである場合とそうでない場合に分かれ、ポリクローナルと想定される各頭における中和抗体応答でも標的特異性につき複数のパターンが存在することが見出された。また、同じ V4 領域でも点変異体とループ欠失変異体とでは、中和標的性が異なる場合が認められた。これに対し、中和抗体非誘導群では Env 変異ウイルス群に対する中和能を高度に示すなど、標的領域の明確な遷移にともなう野生株の中和能喪失が生じたケースは認められず、SIV の中和抵抗性が非常に高度なものである可能性が示唆された。

##### (2) Env 多重変異ウイルスに対する中和スペクトルの時系列解析

前記結果を踏まえ、Env 可変領域多重変異 SIV 株 (V1+V2+V4+V5 領域多重点変異 SIV) を作出した。これを標的ウイルスに用いた中和アッセイを中和抗体誘導サル数頭につき行い、ウイルス中和の経時的な標的特異性を検討した。野生株 SIVmac239 特異的中和能が誘導された SIV 持続感染個体においては、Env V1+V2+V4+V5 領域点変異 SIV に対しても 10-20 週程度のタイムラグを以て特異的な中和能が検出されることを見出した (図 1)。これは、知られている限り最も高度の中和抵抗性を示す SIVmac239 株の、更に中和エスケープ変異が蓄積した亜型に対しても、一定の *in vivo* 条件が揃った個体においては抗体中和が継続することを示しており、過去に報告されていない、高度抗体抵抗性エイズウイルスに対する中和抗体応答の質的持続を示すものである。

##### (3) BCR クローナリティ解析用の単離手法バイアスの検討

予備解析の段階では、合計 14 分子の組合せによる精確な IgG 陽性 PB 集団を定義できる可能性が高く、これに基づく新規性の高い報告が可能と想定されたが、SIV 持続感染サル末梢血単核球におけるウイルス特異的 B 細胞応答を検討した結果、Env 特異的 B 細胞の成熟水準の差により比較する動物群間の B 細胞単離に乖離が生じうる可能性を見出し、これを踏まえ、中和抗体誘導の有無自体による交絡を高度に受けにくい B 細胞単離パネルを使用する必要性が示唆された。以上を鑑みつつ B 細胞ソーティングのパネル変更をさらに行い、CD138 を主体とするパネルに比して CD38 を主体とするパネルの方が有用である可能性が示唆された。測定カラー数を増多した再解析に供した結果も同様であった。さらに各種免疫関連因子の ELISA アッセイを行った結果、ウイルス病原性蛋白質に由来した宿主液性因子の攪乱状態が、これに寄与する可能性が示唆された。一方、別系統の研究で関与が証明された、一部宿主細胞因子の本攪乱への関与は認められなかった。

以上から、液性免疫応答特に B 細胞分化動態に乖離が生じた動物・宿主の群間の比較をバイアス無く行うには、現存しない別の解析手法が必須であり、一方で成熟状態に差分を認めない crude な分化水準に留まる B 細胞集団の比較を行うことはそれ自体の意義が相対的に弱まる。従って、初期に想定したアプローチと対照的に、各 Env 変異株の中和スペクトルと特異的 B 細胞応答の対応関係を評価することが、結果的に最も明瞭に抗ウイルス B 細胞動態をトータルとして機能的に把握可能であることが見出された。今後は、前年度までに検討した CD38 使用型のソーティングパネルに基づき予備的に作出した、B 細胞多様性の評価を可能とする IgG 多型解析系を利用し、評価する動物群の組合せを再考して応答解析の続きを行うことを予定する。

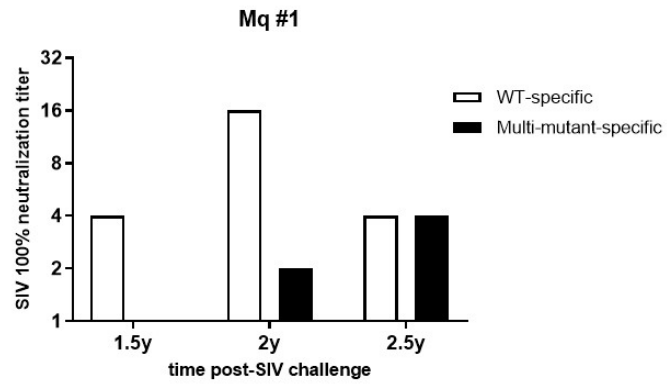


図 1. Env 多重エスケープ変異 SIV に対する中和能の検出例。  
野生株 SIV、及び Env 多重変異 SIV に対する 100%中和能の経時変化を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishii H, Terahara K, Nomura T, Takeda A, Okazaki M, Yamamoto H, Tokusumi T, Shu T, Matano T.	4. 巻 94
2. 論文標題 A Novel Immunogen Selectively Eliciting CD8(+) T Cells but Not CD4(+) T Cells Targeting Immunodeficiency Virus Antigens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01876-19.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01876-19.	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 Hau Trang Thi Thu, Nakamura-Hoshi Midori, Kanno Yoshiaki, Nomura Takushi, Nishizawa Masako, Seki Sayuri, Ishii Hiroshi, Kawana-Tachikawa Ai, Hall William W., Nguyen Thi Lan Anh, Matano Tetsuro, Yamamoto Hiroyuki	4. 巻 512
2. 論文標題 CD8+ T cell-based strong selective pressure on multiple simian immunodeficiency virus targets in macaques possessing a protective MHC class I haplotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213 ~ 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.003	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 Tsukamoto Tetsuo, Yamamoto Hiroyuki, Matano Tetsuro	4. 巻 4
2. 論文標題 CD8+ Cytotoxic-T-Lymphocyte Breadth Could Facilitate Early Immune Detection of Immunodeficiency Virus-Derived Epitopes with Limited Expression Levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00381-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00381-18	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yamamoto H, Kuwata T, Matsuoka S, Ishii H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita S, Seki Y, Sakawaki H, Miura T, Akari H, Matano T
2. 発表標題 Induction of cross-reactive simian immunodeficiency virus-specific neutralizing antibodies in macaques possessing specific germline B cell receptors
3. 学会等名 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, AIDS Panel Agenda（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto H
2. 発表標題 Neutralizing antibodies against SIVmac239: T-cell synergism in protection and induction
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hau TTT, Nomura T, Matano T, Yamamoto H
2. 発表標題 Nef-specific cytolytic CD4+ T-cell responses in a viremic SIV controller receiving acute-phase neutralizing antibody passive infusion
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hau TTT, Nomura T, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Ishii H, Matano T, Yamamoto H
2. 発表標題 Protective and non-protective MHC-I haplotype-associated CD8+ T-cell responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanno Y, Nomura T, Hau TTT, Matano T, Yamamoto H
2. 発表標題 Characterization of neutralizing antibody responses induced in highly neutralization-resistant SIVmac239 infection
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto H
2. 発表標題 Anti-SIV neutralizing antibodies: association with immune escape and controlling immune escape
3. 学会等名 Immunological intervention of lentivirus infection: control versus escape, Center for AIDS Research Seminar, Kumamoto University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hau TTT, Nomura T, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Ishii H, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H
2. 発表標題 MHC-I haplotype-associated CD8+ T-cell responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques
3. 学会等名 2nd Japan-Taiwan Joint Symposium on HIV/AIDS
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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