

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17656

研究課題名（和文）インフルエンザ感染後の肺組織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 response in the lungs upon 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗原変異インフルエンザウイルスにも有効な“交差防御抗体”の誘導を目的としたユニバーサルワクチン開発に向け、交差防御抗体を誘導可能なヘマグルチニン抗原構造に焦点を当てて研究を進めた。その結果、ウイルス感染後の肺組織では二次リンパ組織とは異なり、膜融合型ヘマグルチニン抗原により強く結合する抗体レパートリーが選択されることを明らかとした。この結果は、感染後の肺組織において交差防御抗体の抗原領域を露出した構造変化ヘマグルチニン抗原が生じ、交差防御抗体応答を誘導している可能性を示唆している。また、抗体産生応答に関わる抗原提示細胞上の抗原構造の特定に向けて解析系の整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原変異インフルエンザウイルスにも有効な“交差防御抗体”の誘導を目的とした所謂ユニバーサルインフルエンザワクチンの社会的要請は高く、新規ワクチン剤形シーズ開発が精力的に進められているが実用化は未だ達成されていない。本研究では、世界で主に進められている分子構造学的アプローチとは異なり、ウイルス感染後の交差防御抗体応答を解析するという免疫学的アプローチを基軸とすることでワクチンデザイン戦略における新たな科学的知見が取得した。今後ユニバーサルワクチンシーズ開発と実用化に向けたさらなる進捗が期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focus on the antigenic structure which can induce cross-protective antibody response to obtain the informations for the development of universal influenza vaccine seeds. Here, we found that unique, distinct antibody repertoires which bind better to hemagglutinin antigens with membrane fusion-form than to that with native-form were selected in the lungs but not in secondly lymphoid organs, such as spleen. This data suggests that hemagglutinin structure exposing conserved epitopes such as LAH epitope is arisen and then induces cross-protective antibody response in the lungs after viral infection. Furthermore, we optimized the experimental conditions for identification of the antigenic structure on antigen-presenting cells.

研究分野：免疫学

キーワード：交差防御抗体 インフルエンザウイルス ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原変異インフルエンザウイルスにも有効な“交差防御抗体”の誘導を目的とした所謂ユニバーサルインフルエンザワクチンの社会的要請は高く、新規ワクチン剤形の開発が近年進められている。しかしながら、それらワクチン剤形の実用化は未だ達成できていない。

交差防御抗体はウイルス感染によって誘導されやすいことがヒトおよびマウスにおいて以前より報告されていたが、その産生を担う“交差反応性 B 細胞”の詳細な発達経路は未解明であった。我々は世界に先駆けて抗原特異的な B 細胞の検出という技術的ブレイクスルーを成し遂げ、感染局所の肺組織において交差反応性 B 細胞が優先的に選択されていることを見出した(引用文献)。

さらに上記で得られた免疫学的な知見をヒントにし、交差防御抗体の主要な標的であるヘマグルチニン抗原の構造を変化させることで隠れた抗原領域を露出させるという従来とは異なるコンセプトによって、新規ワクチン剤型の創出に成功した(図1)(引用文献)。

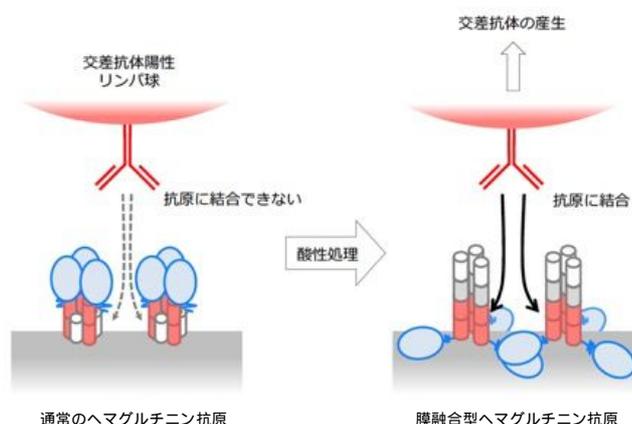


図1 ヘマグルチニン抗原構造を変化させた膜融合抗原では、隠れていた交差防御抗体の結合領域が露出する(模式図)

2. 研究の目的

本研究では、新たな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、交差防御抗体を誘導可能な抗原構造に焦点を当て、肺組織にユニークな交差反応性 B 細胞の選択機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

感染後の生体内に微量にしか存在しないヘマグルチニン抗原を検出し、かつ構造を識別することは挑戦的な検証である。そこで本研究では、(1) B 細胞レパトアの大規模解析による間接的な検証と、(2) 抗原提示細胞上に存在する微量抗原の鑑別抗体による直接的な検出という2つのアプローチを検討した。

(1) 抗原特異的 B 細胞のシングルセル培養システムを用いて、各組織で選択された B 細胞の大規模モノクローナル化を行い、通常構造・膜融合型 HA への結合を比較することで、各組織に存在する抗原構造の差異を間接的に立証する。

(2) B 細胞の活性化に関わる抗原提示細胞上に存在する抗原構造変化を正確に区別するため、濾胞樹状細胞の単離・培養条件の最適化を行う。さらに、通常構造・膜融合型ヘマグルチニンのそれぞれにのみ結合するモノクローナル抗体を新規作製して鑑別抗体とし、各組織の濾胞樹状細胞が提示する抗原構造をフローサイトメトリ・顕微鏡解析により直接的な検出を試みる。

4. 研究成果

(1) B 細胞レパトアの大規模解析による検証

生体内において抗原構造の変化を間接的に検証するため、ヘマグルチニン抗原特異的 B 細胞のシングルセル培養システムを用いて、ウイルス感染させたマウスの各組織(肺、リンパ節、脾臓)で選択された交差反応性の胚中心 B 細胞の大規模モノクローナル化を行った。得られた交差モノクローナル抗体の、通常ヘマグルチニン・膜融合型ヘマグルチニン抗原への結合度を比較検証したが、各組織間において結合度に有意な差は見られなかった。

この結果は、二次リンパ組織（リンパ節や脾臓）では交差反応性 B 細胞の選択頻度は少ないもののその性質は肺組織と変わらないことを示している。すなわち、組織間における交差反応性 B 細胞の選択頻度の差異は、組織間で存在する抗原構造が異なることによる抗体レパトアの差異によるものではなく、組織における構造変化抗原の存在頻度に起因するものであると考察される。

そこで次に、株特異的（交差反応性の無い）胚中心 B 細胞のシングルセル培養を行い、株特異的モノクローナル抗体の通常ヘマグルチニン・膜融合型ヘマグルチニン抗原への結合度を調べた。その結果、株特異的抗体においても膜融合型ヘマグルチニン構造により強く結合する複数クローンが肺組織で確認された（図 2）。さらに、この株特異的モノクローナル抗体には肺組織における交差防御抗体の主要な抗原領域である LAH (Long alpha helix; 60 アミノ酸残基程度の長いヘリックス) を含む幹領域に結合するクローンが存在していた。

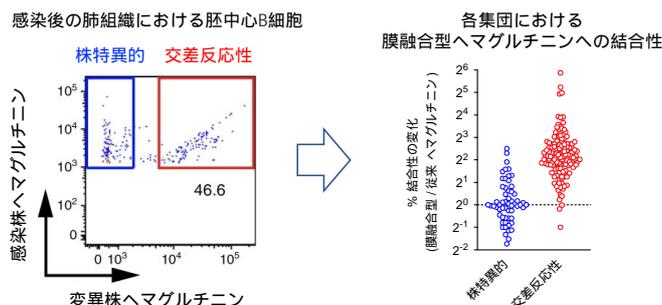


図 2 感染後の肺組織で選択された胚中心 B 細胞における膜融合型ヘマグルチニンへの結合性

交差防御抗体の抗原領域 LAH が存在する幹領域はヘマグルチニン抗原上において立体障害で隠れており（図 1 の左；通常のヘマグルチニン抗原）この領域に結合する抗体は感染後の二次リンパ組織（特に脾臓）では極めて頻度が少ない。そのため肺組織における株特異的および交差反応性の胚中心 B 細胞の両者において膜融合型ヘマグルチニン抗原へより強く結合するクローンが確認できたことは、肺組織では交差防御抗体の抗原領域を露出した構造変化した抗原の存在を強く支持すると考えられる。

（ 2 ） 抗原提示細胞上に存在する微量抗原の検出

次に、抗原提示細胞（濾胞樹状細胞）上における抗原の構造を直接的に検証するために、濾胞樹状細胞の調整・単離条件を検討した。濾胞樹状細胞は、B 細胞免疫において重要な役割を果たしているが、極めて単離・培養が困難なため解析系に関する知見が少なく、また統一的方法論が未だ確立されていない。そこでまず初めに、濾胞樹状細胞の検出および単離条件の最適化を行った。これまでの報告において濾胞樹状細胞は、CD45 陰性の細胞集団中における CD21 陽性細胞という 2 つのマーカープロファイルで定義あり、更に FDC-M2、PDPN、CD31、ICAM などのマーカーで更なる細胞集団の細分化と、濾胞樹状細胞の純度向上を試みた。

さらに濾胞樹状細胞の培養に向け、肺組織などからの細胞調整条件（コラゲナーゼ/DNase 処理濃度・時間）細胞濃縮条件（CD45, CD21 マグネティックビーズ処理）培養条件の検討を行った。培養細胞をマーカーである FDC-M2/M1, CD21/35 抗体で染色した結果、コントロール細胞（CD45-, CD21+）では確認されなかった濾胞樹状細胞マーカーの発現が確認された。しかしながら、現状の条件では得られる細胞数は極めて少ないためさらなる最適化を進める一方、single-cell RNA-seq による網羅的な検出・遺伝子解析などの方法を模索する必要があると考えられる。

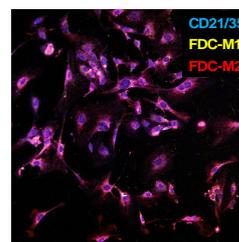


図 3 培養細胞の免疫染色

今後、本研究で得た結果や実験条件をさらに発展させて解析を進め、感染肺組織にユニークな抗原を検出しその構造を解き明かすことで、交差防御抗体を効率的に誘導可能なより良いワクチン剤形に関する知見が得られることが期待できると考えられる。

＜引用文献＞

Yu ADACHI et al., Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *Journal of Experimental Medicine* (2015) 212 (10): 1709-1723.

Yu ADACHI et al., Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies. *Nature communications* (2019) 10(1) 3883.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Akiko, McCarthy Kevin R., Kuraoka Masayuki, Schmidt Aaron G., Adachi Yu, Onodera Taishi, Tonouchi Keisuke, Caradonna Timothy M., Bajic Goran, Song Shengli, McGee Charles E., Sempowski Gregory D., Feng Feng, Urick Patricia, Kepler Thomas B., Takahashi Yoshimasa, Harrison Stephen C., Kelsoe Garnett	4. 巻 177
2. 論文標題 Antibodies to a Conserved Influenza Head Interface Epitope Protect by an IgG Subtype-Dependent Mechanism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1135.e16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.03.048	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 Leach Sarah, Shinnakasu Ryo, Adachi Yu, Momota Masatoshi, Makino-Okamura Chieko, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J, Fukuyama Hidehiro, Takahashi Yoshimasa, Kurosaki Tomohiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Requirement for memory B-cell activation in protection from heterologous influenza virus reinfection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 771 ~ 779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz049	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 Bajic Goran, Maron Max J., Adachi Yu, Onodera Taishi, McCarthy Kevin R., McGee Charles E., Sempowski Gregory D., Takahashi Yoshimasa, Kelsoe Garnett, Kuraoka Masayuki, Schmidt Aaron G.	4. 巻 25
2. 論文標題 Influenza Antigen Engineering Focuses Immune Responses to a Subdominant but Broadly Protective Viral Epitope	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 827 ~ 835.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2019.04.003	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 Adachi Yu, Tonouchi Keisuke, Nithichanon Arnone, Kuraoka Masayuki, Watanabe Akiko, Shinnakasu Ryo, Asanuma Hideki, Aina Akira, Ohmi Yusuke, Yamamoto Takuya, Ishii Ken J., Hasegawa Hideki, Takeyama Haruko, Lertmemongkolchai Ganjana, Kurosaki Tomohiro, Ato Manabu, Kelsoe Garnett, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11821-6	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 安達 悠, 登内 奎介, 高橋 宜聖	4. 巻 69
2. 論文標題 【インフルエンザウイルスと防御】隠れたインフルエンザヘマグルチニンエピトープに対する交差防御抗体	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Moriyama Saya, Adachi Yu, Tonouchi Keisuke, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 1254
2. 論文標題 Memory B Cells in Local and Systemic Sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-15-3532-1_5	査読の有無 無
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 Kuraoka Masayuki, Adachi Yu, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 32
2. 論文標題 Hide and seek: interplay between influenza viruses and B cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 605 ~ 611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa028	査読の有無 無
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 Tonouchi Keisuke, Adachi Yu, Moriyama Saya, Sano Kaori, Tabata Koshiro, Ide Keigo, Takeyama Haruko, Suzuki Tadaki, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 32
2. 論文標題 Stereotyped B-cell response that counteracts antigenic variation of influenza viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 613 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa038	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 Sugimoto-Ishige Akiko, Harada Michishige, Tanaka Miho, Terooatea Tommy, Adachi Yu, Takahashi Yoshimasa, Tanaka Takashi, Burrows Peter D, Hikida Masaki, Takemori Toshitada	4. 巻 33
2. 論文標題 Bim establishes the B-cell repertoire from early to late in the immune response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 79 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa060	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0件

〔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
---------	---------