

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05989

研究課題名(和文) シングルセルRNA-seqを用いた抗HIV抗体投与による寛解メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of remission mechanism by administration of anti-HIV antibody using single cell RNA-seq

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・特任准教授

研究者番号：70346063

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)：HIV感染者にウイルスを抑制する免疫を誘導して抗ウイルス薬の必要ない寛解状態に至るメカニズムを解明するため、抗体投与によりウイルス増殖が抑制されたSHIV感染カニクイザルのリンパ節をsingle cell RNA sequencingによって解析した。カニクイザルの細胞群特定の新たなマーカー遺伝子を同定し、T細胞、B細胞、centroblast、centrocyte、plasmablast、NK細胞、単球、mDC、pDCに細胞群を分類して解析したが、ウイルス抑制に関連する遺伝子発現パターンをみつけることはできなかった。解明にはサンプル数を増やし、少数の細胞群を個別に解析していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

効果的な治療薬の開発によってHIV感染者の治療は劇的に進歩しましたが、それでも抗ウイルス薬の服用を生涯続ける必要があり、感染者にとっては大きな負担です。また、感染者が年々増加することによる医療費の増加も将来的には大きな問題となります。本研究では、抗HIV抗体の投与によってウイルス増殖を持続的に抑えるメカニズムの解析を行いました。ウイルス抑制にはCD8+細胞が大きな役割を果たしていることがサル・モデルで示唆されていますが、そのメカニズムは分かっていません。本研究を発展させることで、抗ウイルス薬の投与なしでウイルス増殖を持続的に抑制する免疫療法の開発につながると考えています。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of HIV remission, no viral replications in the absence of ART, single cell RNA sequencing were performed using cells from lymph nodes of cynomolgus monkeys, which were infected with SHIV and suppressed viral replication by antibody administration. New marker genes for cynomolgus monkeys were identified by clustering cells based on the gene expression pattern, and cells were classified into T, B, centroblast, centrocyte, plasmablast, NK, monocyte, mDC and pDC. Gene expression patterns of these cell subsets were compared between monkeys suppressing viral replication and those showing no viral suppression, while the gene expression pattern that was associated with viral suppression was not identified. More samples and the detailed analysis of small cell subsets will be required to clarify the mechanism of HIV remission.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗体 HIV 寛解 single cell RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

(1) 投与回数のない抗 HIV 薬の開発

効果的な抗 HIV 療法の進歩により、HIV 感染患者の予後は著しく改善し、感染者を治療することで新たな感染を予防できることも証明されました。「治療による予防」の概念は、UNAIDS が提唱する 90-90-90 目標にも反映されています。90-90-90 目標とは、2020 年までに (1) 感染者の 90% 以上が感染を自覚する、(2) HIV 陽性と診断された人の 90% 以上が治療を受ける、(3) 治療中の感染者の 90% 以上がウイルスを抑制する、ことを目指すものです。この計画によって検査や治療を受ける感染者の割合は大きく増加しましたが、発表されている 2019 年の検査-治療-抑制の割合は、81%-67%-59%に留まっており、2020 年の目標達成は難しい状況です。

「エイズ発症阻止」と「治療による予防」は効果的な治療薬の実現によって可能になりましたが、それでも最低 1 日 1 回の服用を生涯続ける必要があり、感染者にとっては大きな負担です。また、感染者が年々増加することによる医療費の増加も将来的には大きな問題となります。これらの問題は、感染者にウイルスを抑制する免疫を誘導し、抗ウイルス薬の投与なしでウイルス増殖を持続的に抑制することができれば解決します。近年、抗 HIV 抗体の投与によってウイルス増殖を持続的に抑える CD8⁺細胞を誘導することが示されました。これが実用化できれば、数回の抗体投与でウイルスを抑制し、感染者の「エイズ発症阻止」と新規感染を防ぐ「治療による予防」が現実的となります。

(2) CD8⁺細胞によるウイルス抑制メカニズム

抗 HIV 抗体投与によるウイルス抑制には、CD8⁺細胞が大きな役割を果たしていることがマカク属のサルを用いた感染モデルで示唆されています。SIV-HIV-1 キメラウイルス (SHIV) に感染したサルの感染初期に HIV-1 の Env V3 領域に対する抗体を投与すると、投与した抗体が消失した後もウイルスが増殖しない、いわゆる寛解状態となる個体がみられました。この個体に抗 CD8 抗体を投与して CD8⁺細胞を除去するとウイルスが再び検出されることから、CD8⁺細胞がウイルス抑制に働いていることが示されています。投与された抗 HIV-1 抗体が樹状細胞などによる抗原提示を促進し、効果的な CD8⁺細胞の誘導に働くのではないかと推測されていますが、そのメカニズムは解明されていません。寛解状態に至るための CD8⁺細胞誘導のメカニズムは、HIV 感染者の抗体療法を開発する上で非常に重要な課題となっています。

2. 研究の目的

(1) 抗体投与による寛解のメカニズムを解明する

本研究の目的は、抗体投与によって寛解状態となるメカニズムの解明です。SHIV 感染サルに申請者らが開発した抗 V3 抗体 (特許申請中) を投与すると、一部のサルが寛解状態となります。使用している抗 V3 抗体は、近年多くの解析が行われている中和活性の高い bnAb (broadly neutralizing antibody) とは異なり、サブタイプ B への特異性が高く、中和活性はそれほど高くないものの、ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) 活性を持った抗体です。抗 V3 抗体を用いた類似の研究は行われておらず、現状では抗 V3 抗体投与による寛解の唯一のモデル系です。抗 V3 抗体投与によって寛解状態となったサルに抗 CD8 抗体を投与するとウイルス増殖がみられることから、CD8⁺細胞がウイルス抑制に働いていることが確認されました。この結果に基づき、ウイルス抑制に働く CD8⁺細胞の誘導メカニズムをあきらかにします。

(2) Single cell RNA sequencing によるリンパ節の解析

single cell RNA sequencing は個々の細胞にバーコードを付与した mRNA ライブラリを作成し、数千個の細胞の遺伝子発現プロファイリングを包括的に実施できます。このため、リンパ節内の T 細胞、B 細胞、樹状細胞などの細胞群の同定を特定のマーカーではなく、遺伝子発現パターンから行うことができます。また、寛解状態のサルに特異的な遺伝子発現パターンの解析も可能になり、ウイルス抑制に重要な細胞群の増減や、活性化、分化のシグナルをあきらかにできます。single cell RNA sequencing によって、ウイルス抑制と関連する細胞群や活性化、分化に関わる遺伝子発現を特定して、ウイルス抑制に働く CD8⁺細胞の誘導メカニズムをあきらかにします。

3. 研究の方法

(1) SHIV 感染サルのリンパ節の採取

SIV-HIV-1 キメラウイルス (SHIV) 89.6P 株に感染したカニクイザルに、感染後 3, 10, 17 日にカイコで産生した抗 V3 抗体 1C10 を投与した。リンパ節はウイルス感染前と感染後 4 週、または 8 週で採取した。ウイルス増殖を抑制した 6 頭 (4 週 2 頭、8 週 4 頭) と抑制しなかった 4 頭 (4 週 1 頭、8 週 3 頭) 1C10 を投与していない 1 頭 (4 週) のリンパ節を採取してリンパ球を分離し、解析に用いた。

(2) single cell RNA sequencing 解析

採取したリンパ節から分離したリンパ球から 10x genomics 社の Chromium Controller を用いて cDNA ライブラリーを調製し、Illumina 社の次世代シーケンサー HiSeq を用いてシーケンス・データを取得した。得られたシーケンス・データを Ensembl で公開されているカニクイザルのリファレンス・シーケンスを用いて 10x genomics の Cell Ranger で解析用のフォーマットに変換した。Single cell RNA sequence 解析用ソフトウェアの Seurat を用いて細胞をクラスタリングして、マーカー遺伝子により T 細胞、B 細胞、樹状細胞などの細胞群を同定した。また、各細胞群の割合や遺伝子発現の変化をウイルス感染前と感染後、ウイルス抑制群と非抑制群などで比較した。

4. 研究成果

(1) カニクイザルの細胞群の同定

これまでにカニクイザルのリンパ節の解析例がほとんど報告されていないため、細胞群を同定するための情報が不足していた。このため、Seurat でクラスタリングした各細胞群の遺伝子発現を解析し、細胞群特定に使用するためのマーカー遺伝子の探索を行った(図1)。T細胞、B細胞はヒトと同様に CD3D, CD3G, CD4, CD8A, MS4A1 (CD20)などのマーカー遺伝子がカニクイザルでも良いマーカーとなった。検討の結果、NK細胞は IL7R, S100A4, NKG7, FCER1G, HOPX、B細胞は HLA-DRA, MS4A1, CD19、Centroblast、Centrocyte は HLA-DRA, MS4A1, CD19 に加えて RGS13、CB はさらに MKI67、plasmablast は SLC23A1, PDIA4 をマーカーとした。単球はヒトで使用される CD14 の発現が弱く、AIF1, LYZ を加えた。樹状細胞 (DC) は AIF1, LYZ, CD83, IRF8 をマーカーとし、CD83, IRF8, CD4, FCER1G によって myeloid DC (mDC) と plasmacytoid DC (pDC) に分類した(図2)。T細胞は、さらに naive CD4⁺ T細胞、central memory CD4⁺ T細胞、effector memory CD4⁺ T細胞、follicular helper CD4⁺ T細胞、regulatory T細胞、naive CD8⁺ T細胞、effector memory CD8⁺ T細胞、double negative T細胞、proliferating T細胞、activated T細胞のサブセットに分類した。

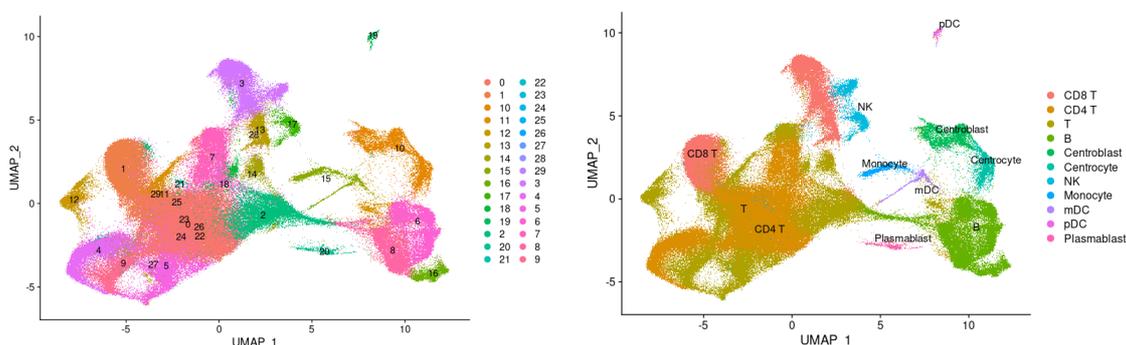


図1 遺伝子発現によってクラスタリングしたカニクイザルのリンパ節細胞

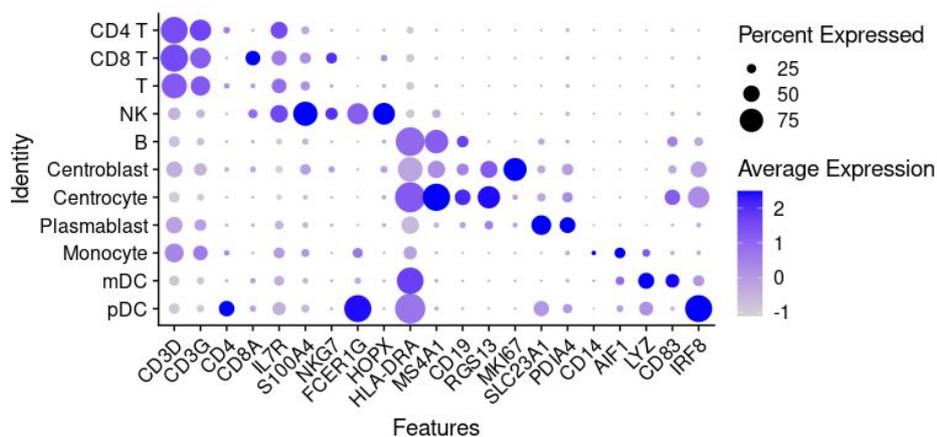


図2 カニクイザルのリンパ節細胞サブセットのマーカー遺伝子

(2) ウイルス抑制と関連する細胞群の探索

サル群ごとに細胞の割合を比較すると、ウイルス感染の標的である CD4⁺ T 細胞の割合は、抗体を投与していないサルでは著しく低いが、ウイルス抑制群と非抑制群に大きな差はなかった。CD8⁺ T 細胞の割合も、抗体を投与していないサルは他のサルに比べて高くなっていったが、ウイルス抑制群と非抑制群に大きな差はなかった。他の細胞群でも、抗体を投与していないサル以外に大きな差はみられなかった。

遺伝子発現の解析では、CD4⁺ T 細胞で TIGIT, APOD, GIPC2, PLAC8, MYL9, RAB11FIP1 などの

遺伝子発現がウイルス抑制群の一部のサルで上昇していたが、有意な差ではなかった。GADD45B はサル群間で著しく発現が変化したが、リンパ節細胞を凍結せずにライブラリ作成を行った感染後 4 週のサンプルで遺伝子発現が低くなっていることから、細胞の採取日時や凍結が大きく影響していると考えられた（図 3）。逆に言うと、抑制群と非抑制群の遺伝子発現の違いは顕著ではなく、わずかな違いがウイルス抑制につながっている可能性が考えられた。

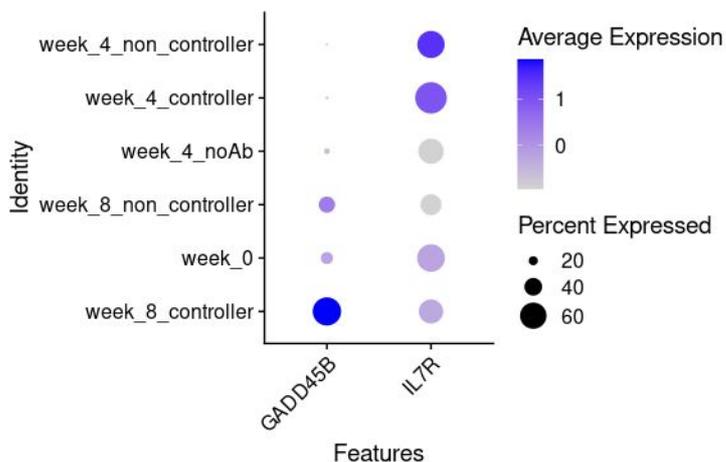


図 3 サル群間の CD4⁺ T 細胞における GADD45B と IL7R の遺伝子発現の比較

細胞群や遺伝子発現の変化を統計的に解析するためには、今回のサンプル数は十分ではなく、本研究の解析でウイルス抑制に関連する細胞群や遺伝子発現を同定することはできなかった。しかしながら、比較的細胞数が豊富な CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、B 細胞の遺伝子発現パターンには、抑制群と非抑制群で顕著な違いが見られなかったため、細胞数は少ないが抗原提示に重要な役割を果たしている樹状細胞などが決定的な役割を果たしている可能性が考えられた。このような少数の細胞群を解析するためには、狙いの細胞群を分離して十分な細胞数を確保してライブラリを作成し、個別に詳細な解析していくことが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsumoto Kaho, Kuwata Takeo, Tolbert William D., Richard Jonathan, Ding Shilei, Prevost Jeremie, Takahama Shokichi, Judicate George P., Ueno Takamasa, Nakata Hiroto, Kobayakawa Takuya, Tsuji Kohei, Tamamura Hirokazu, Smith Amos B., Pazgier Marzena, Finzi Andres, Matsushita Shuzo	4. 巻 97
2. 論文標題 Characterization of a Novel CD4 Mimetic Compound YIR-821 against HIV-1 Clinical Isolates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01638-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01638-22	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, Matsumoto Kaho, Kuwata Takeo, Zahid Hasan Md, Biswas Shashwata, Gorny Mirosław K., Matsushita Shuzo	4. 巻 2
2. 論文標題 Development and characterization of a panel of anti-idiotypic antibodies to 1C10 that cross-neutralize HIV-1 subtype B viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 932187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fviro.2022.932187	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 Judicate GP, Barabona G, Kamori D, Mahiti M, Tan TS, Ozono S, Mgunya AS, Kuwata T, Matsushita S, Sunguya B, Lyamuya E, Tokunaga K, Ueno T	4. 巻 12
2. 論文標題 Phenotypic and Genotypic Co-receptor Tropism Testing in HIV-1 Epidemic Region of Tanzania Where Multiple Non-B Subtypes Co-circulate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 703041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.703041	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 Matsuoka S, Kuwata T, Ishii H, Sekizuka T, Kuroda M, Sano M, Okazaki M, Yamamoto H, Shimizu M, Matsushita S, Seki Y, Saito A, Sakawaki H, Hirsch VM, Miura T, Akari H, Matano T	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

1. 著者名 Nomura Y, Matsuoka S, Okazaki M, Kuwata T, Matano T, Ishii H	4. 巻 13
2. 論文標題 Neutralizing Antibody Induction Associated with a Germline Immunoglobulin Gene Polymorphism in Neutralization-Resistant SIVsmE543-3 Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13061181	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 Kobayakawa T, Tsuji K, Konno K, Himeno A, Masuda A, Yang T, Takahashi K, Ishida Y, Ohashi N, Kuwata T, Matsumoto K, Yoshimura K, Sakawaki H, Miura T, Harada S, Matsushita S, Tamamura H	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 Medical 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 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本佳穂, 桑田岳夫, 高濱正吉, George P Judicate, 上野貴将, 小早川拓也, 玉村啓和, 松下修三
2. 発表標題 CD4類似化合物YIR-821は多くのHIV-1臨床株に有効である
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本佳穂, 桑田岳夫, Zahid Md H, 郭悠, Biswas S, 高濱正吉, 玉村啓和, 松下修三
2. 発表標題 CD4類似化合物YIR-821によるサブタイプB HIV-1患者抗体の活性増強効果
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Biswas S, Yamauchi S, Morioka H, Kaku Y, Kuwata T, Matsushita S
2. 発表標題 Anti-Idiotypic antibodies as sorting probes to isolate anti-CD4i antibodies
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村柚仁、松岡佐織、岡崎みどり、桑田岳夫、俣野哲郎、石井洋
2. 発表標題 中和抗体抵抗性SIV感染サルにおいて免疫グロブリン遺伝子多型が中和抗体誘導に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第35回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗HIV-1 V3抗体1C10 (0.5) に結合する抗体及びその抗原結合断片並びにその応用	発明者 松下修三、郭悠、桑田岳夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/036760	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

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2020-553897	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------