

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890040

研究課題名（和文） サル免疫不全ウイルス感染細胞に対する抗体依存性細胞性ウイルス複製抑制機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of antibody-dependent cellular virus inhibition (ADCVI) against SIV-infected cells

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 研究員

研究者番号：80574615

研究成果の概要（和文）：

個体レベルでのエイズウイルス持続感染成立阻止に極めて重要な中和抗体の感染細胞レベルにおける防御効果の解析を目的に、抗体依存性細胞性ウイルス複製抑制（ADCVI）アッセイ系を確立し、抗体の結合性、ADCVI能、中和能の関係性を描出した。ADCVI単独による感染防御能の推定を目的に、抗SIV・非中和抗体の感染サル受動免疫を行った結果、制御への寄与を認めず、中和抗体によるエイズウイルス制御におけるADCVIの寄与は限定的である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

AIDS virus neutralizing antibodies can play a critical role in acute phase non-sterile virus replication control in vivo. To assess the contribution of antibody-mediated innate inhibitory effects on virus-infected cells within this process, an in vitro antibody-dependent cellular virus inhibition (ADCVI) assay system was established. Virus-binding avidity of antibodies correlated with ADCVI while they did not correlate with neutralizing activity. For direct estimation of ADCVI contribution, anti-SIV antibodies selectively withholding ADCVI but not neutralizing activity were passively immunized against SIV-infected macaques, which did not result in palpable viremia reduction or exertion of selective pressure in viral genome sequences. Taken together, the role of ADCVI in neutralizing antibody-based non-sterile SIV control in vivo was suggested to be limited.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	0	1,160,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	378,000	2,798,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、感染症、動物、ゲノム、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

エイズウイルス感染症の制御において特異的T細胞応答の重要性は従前より指摘されて

きたのに対し、中和抗体を代表とする液性免疫応答の位置付けは明らかとなっていなかった (Poignard et al, Immunity 4: 431-438,

1999)。これに対し申請者は近年 SIV 感染サルエイズモデルにおいて、感染成立後初期の中和抗体受動免疫により特異的 T 細胞の誘導亢進が生じ、顕著な持続感染阻止効果が呈される事を初めて証明した (Yamamoto et al, PLoS ONE 2: e540, 2007; Yamamoto et al, J Virol. 83: 5514-5524, 2009)。この報告においては、抗体の中和能に加え、新たな作用機序の一つとして樹状細胞への中和抗体・ウイルス粒子複合体取込み・抗原提示亢進が関わる可能性が見出されている (Yamamoto et al, Rev Med Virol. 18: 293-303, 2008)。それらの一方でウイルス特異抗体によるもう一つの防御機序として、自然免疫エフェクター細胞の活性化を介した感染細胞の排除が考えられる。

標的細胞がエンベロープウイルスの感染を受ける際には、侵入・子孫ウイルス産生の双方に由来する外被 (エンベロープ) 蛋白が細胞膜表面に残存・発現する。これに結合するエンベロープ特異抗体の Fc 領域が何らかの分子間相互作用で認識されることで、NK 細胞を代表とする自然免疫エフェクター細胞が活性化される。その際の標的細胞殺傷能を放射性同位体ほか細胞破壊マーカーの放出量で評価したのが狭義の ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity, 抗体依存性細胞傷害) であるが、より広義のウイルス学的評価法として、試験管内での最終的な子孫ウイルス産生量の抑制能を評価する方法も近年になって提唱されている。

これを ADCVI (antibody-dependent cellular viral inhibition, 抗体依存性細胞性ウイルス複製抑制) と称するが (Landucci et al, J Virol 75: 6953-6961, 2001)、このウイルス複製抑制がどのような機序の総和として達されるかは依然明らかではない。精度を高めた実験系でそれらを解明する学術的意義は、ウイルス感染時における液性免疫と自然免疫の接点を明らかにするという意味において大きいと考えられる。

この機構は、感染前に受動免疫した HIV/SIV キメラエイズウイルス (SHIV) 中和抗体による SHIV 感染成立の狭義の阻止に寄与している可能性が示唆されているが (Hessell et al, Nature 449: 101-104, 2007)、その報告においても ADCVI 単独での貢献度や関与する分子群は明らかではなく、作用を担うエフェクターの検索もなされていない。また、感染後急性期の中和抗体受動免疫によりウイルス複製制御を来した申請者の実験系における関与も未解明である。加えて、エフェクター・標的細胞の動物種をそろえた ADCVI の解析系は報告されていない。

当該研究はこれらの先行研究を踏まえ、中和抗体に加えて非・中和抗体も含めたエイズウイルス特異抗体のエフェクター細胞存在下

での広義のウイルス複製抑制能を試験管レベル、また必要に応じて感染個体レベルにおいて検討する。

2. 研究の目的

サル免疫不全ウイルス特異抗体の感染細胞レベルにおける防御効果の解析を目的に、サル末梢血単核球 (PBMC) をエフェクター細胞、サル CD4 陽性 T 細胞株を標的細胞とする抗体依存性細胞性ウイルス複製抑制

(ADCVI) アッセイ系の確立を行った。期間内において、次の 4 点につき解明を目的とした。

(1) どのような機序の総和 (直接的な細胞殺傷および抗ウイルスサイトカイン/その他マーカー分子産生) として抗 SIV 抗体存在下で ADCVI が呈されるのかを、細胞内サイトカイン染色法および培養上清中へのウイルス抑制因子放出から評価する。

(2) SIV 中和抗体と SIV 結合・非中和抗体における ADCVI の力価の相違を測定し、中和能の差との乖離の程度を比較することで、エイズウイルス感染局所における防御能の指標として何が好適と考えられるかを検討する。

(3) どのような末梢血中のリンパ球サブセットが ADCVI を担うのかをこれまでより絞って同定し、その機能阻害を行う実験系を検索する。

(4) 上記の結果を踏まえて必要に応じ、個体レベルにおいて ADCVI 能の SIV 持続感染阻止に果たしうる役割を動物実験において直接評価する。

この当初案の下、研究経過により (2)、(4) が重要と考えられたので選択的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 2010 年度

①試験管内においてカニクイサル不死化 CD4 陽性 T 細胞である HSC-F 株に高病原性 SIV_{mac239} 株を MOI 0.005 で 6 時間感染させ、E:T 比 1:4 にてウイルス非感染サル由来 PBMC と各種の SIV 感染サルそれぞれ単独に由来する抗 SIV ポリクローナル抗体の存在下で共培養を 7 日間行い、上清中ウイルス量を Gag 蛋白の ELISA 法にて測定して、ADCVI 活性の定量を行った。

②別途作製した不活化 SIV 全粒子を抗原とする ELISA 法で評価したウイルス粒子結合性と照応した。

③この樹立系に基づいて各個体由来精製のポリクローナル抗体を検討し、ADCVI 能と各個体の病態の相関を調べた。

(2) 2011 年度

④前年度に樹立した系に基づき ADCVI に関わる受容体を検索した。

⑤前年度の各感染個体由来ポリクローナル抗体の性状解析結果（後述）を踏まえ、個体レベルにおける ADCVI 能の SIV 感染防御に対する寄与を直接推定することを目的に加えた。そのために生理的濃度域（1mg/ml vs MOI=0.005）でウイルス中和能を有さず、ADCVI 能のみを選択的に有することを確認した抗 SIV ポリクローナル非中和抗体

（300mg）のアカゲサル SIV 感染急性期における受動免疫を、別途目的も兼ね行った。受動免疫時（感染後 7 日目）以降、背景研究において受動免疫抗体の検出限界となった 7 日後（感染後 14 日目）までの血中ウイルス量の変動を調べた。

⑥非中和抗体受動免疫群における感染後 14 日目の血漿中 SIV エンベロープ領域の塩基配列解析を行った。

4. 研究成果

(1) 2010 年度

①生理的範疇の濃度（0.1~1mg/ml）の中和抗体による高い ADCVI 能を確認し、同程度の濃度の非・中和 SIV 特異抗体においては高い ADCVI 能を認める群と認めない群に分かれた。

②非中和抗体の 2 群に関しては、別途得られた不活化 SIV 全粒子を抗原とする ELISA 法で評価したウイルス粒子結合性と照応した結果、粒子結合性の低いサル由来特異抗体ほど ADCVI 能も低い傾向が認められた（図 1）。

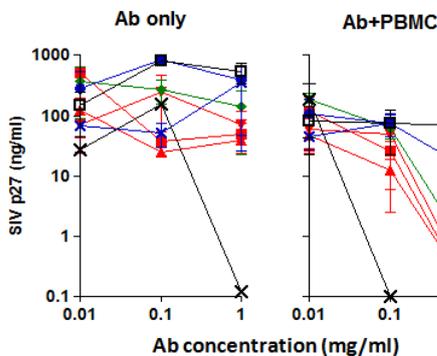


図1. 各SIV感染サル個体由来抗体のADCVI能を示す。横軸は培養系における抗体濃度、縦軸は培養上清中のSIV p27抗原量を示す。パネル左が抗体単独、パネル右が非感染個体由来PBMC共在下での培養結果を示す。赤: SIV結合非・中和抗体、粒子結合度高、緑: 同、粒子結合度: 中、青: 同、粒子結合度: 低、黒x印: SIV中和抗体、黒口印: 対照抗体。

③一方、粒子結合性及び ADCVI 能が高い SIV 特異的非・中和抗体を誘導するサル個体は、(A)感染初期に一定以上の体内ウイルス量を示し、(B)一定期間後に複製制御（血中ウイルス RNA コピー数が検出限界以下に至った

状態）を示した個体ないし高度に血中ウイルス量が抑制された個体に限られることが認められた（図 2、赤線個体）。

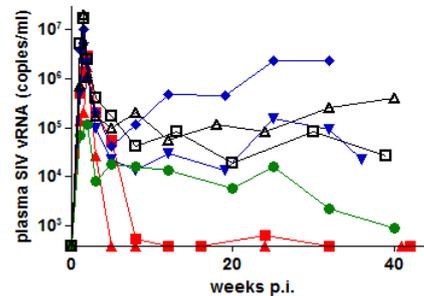


図2. ADCVI, ELISA粒子結合能で層別化したSIV感染個体の血中ウイルス量を示す。赤: ADCVI/結合能高値、緑: 同中間値、青: 同低値、黒: 同中間値、中和能陽性。

以上から、細胞傷害性 T リンパ球を主体として感染初期に有効な SIV 制御に至る個体においても、ウイルス中和能で検出し得ない形の十分な液性免疫応答が認められる可能性が示唆された。

(2) 2011 年度

④ADCVI に関わる受容体を検索した結果、CD64 (FcγRI) は関与せず、CD16 (FcγRIII) は部分関与する可能性が示唆された。

⑤サル受動免疫時（感染後 7 日目）から 3 日後（感染後 10 日目）、7 日後（感染後 14 日目）の血中ウイルス量及び CD4 陽性 T 細胞数の変動を調べた。結果、受動免疫後 7 日間におけるウイルス量の削減率は非中和抗体受動免疫群（n = 5）と対照群（n = 6）の間で有意な差を認めなかった（図 3）。

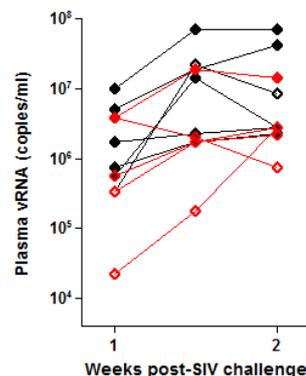


図3. サルSIV感染後7日目の抗SIV・非中和抗体受動免疫による血中ウイルス量の変化。黒線: 対照群、赤線: 非中和抗体受動免疫群を示す。

⑥上記の非中和抗体受動免疫モデルでは、感染後 14 日目の血漿中 SIV エンベロープ領域

において近年報告されたような ADCC エスケープ (Kent, 2011) に類するドミナントな変異選択は認めず、宿主内で選択圧がかかる水準の ADCVI 能を発揮するには極めて高い力価が求められることが分かった。

以上から、中和抗体によるエイズウイルス持続感染成立阻止における ADCVI の寄与の度合いは、有効な細胞性免疫応答の誘導に至るまでの補助作用に留まる可能性が示唆された。本結果は、抗体誘導型予防エイズワクチン開発への基礎情報を与えるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yamamoto H, Matano T. Neutralizing antibodies in SIV control; co-impact with T cells. Vaccine, 査読有, 28S2: 2010, 13-17.

[学会発表] (計 2 件)

① 山本浩之. 中和抗体による感染防御機構: サルエイズモデルにおける解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術総会, 2010 年 11 月 9 日、徳島.

② Nakane T, Matano T, Yamamoto H. Post-infection passive immunization of SIVmac239-specific, non-neutralizing antibodies does not control virus replication in vivo.

IUMS 2011 (兼 第 59 回日本ウイルス学会学術集会)、2011 年 9 月 15 日、札幌.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1)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・

研究員

研究者番号: 80574615

(2)研究分担者

無し

()

研究者番号:

(3)連携研究者

無し

()

研究者番号: