

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860348

研究課題名(和文) 高度のエイズウイルス中和抗体誘導を示す新規サル群の感染免疫学的解析

研究課題名(英文) Virological and immunological analysis of neutralizing SIV antibody-inducing macaques

研究代表者

山本 浩之 (YAMAMOTO, Hiroyuki)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：80574615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高度の抗体抵抗性を示すサル免疫不全ウイルス株(SIVmac239)に対して中和抗体(NAb)を高率に誘導するサル群を新規同定し、NAb非誘導群との感染免疫学的比較を行った。NAb誘導群には特徴的なNef変異体選択がCTLエスケープにより先行して生じた。この変異体ウイルスは機能不全で累積するTヘルパー細胞に対し細胞死を亢進させ、更にB細胞活性化・分化の主要経路の抑制を解除する表現型であった。

研究成果の概要(英文)：We identified a subgroup of macaques inducing neutralizing antibodies (NAbs) against a highly antibody-resistant immunodeficiency virus strain SIVmac239, and compared virological and immunological profiles with NAb non-inducers. NAb inducers commonly showed prior selection a Nef mutant virus via specific patterns of CTL pressure. This mutant virus exerted a counterintuitive, proapoptotic property against Th cells showing dysfunctional accumulation in vivo, and also ameliorated suppression of B-cell maturation by wild-type Nef. These together comprise a hallmark boosting event for successful Ab responses in vivo.

研究分野：ウイルス感染免疫学

キーワード：HIV SIV 中和抗体 CTL エイズ B細胞

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 ; サル免疫不全ウイルス、SIV) はメモリーCD4 陽性 T 細胞指向性を示すレトロウイルスであり、感染初期に T 細胞応答不全と NAb 反応の欠失・遅延を伴い慢性・持続感染化する。

これに対し筆者は近年、SIV 感染急性期の NAb 受動免疫が T 細胞機能亢進を伴った持続感染阻止能を示すことを霊長類モデルで示し、その機序として樹状細胞への Fc 依存性 NAb-ウイルス複合体取込みによる抗原提示が関わる可能性を見出した。本結果は予防ワクチンによるエイズウイルス NAb 誘導の意義を初めて示した重要な知見である。

本研究では上記を踏まえ、予防ワクチン開発への主課題となる、HIV・SIV 初感染時の NAb 誘導阻害の機序解明を試みる。

2. 研究の目的

通常感染時にエイズウイルス NAb 誘導にきわめて高度な阻害が生じる *in vivo* の機構は不明である。本研究ではその病態を解明する重要な手がかりとして、新規に同定した、最も抗体抵抗性が高い SIV に対しても有効な NAb 誘導を示すサル群の表現型を解析する。そのために Env 抗原性が糖鎖被覆などで低く、初感染株に対する NAb すら通常では誘導が困難な分子クローン SIVmac239 に感染したアカゲサル群の抗体誘導状況を 8 年に亘りスクリーニングした。結果、中和抵抗性が高いはずの SIVmac239 に対しても、高力価の NAb を感染後半年で誘導しうる一群 (NAb 誘導群) を初めて見出した (図 1、右)。

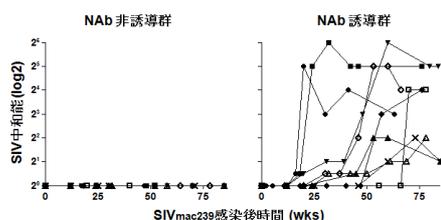


図 1. 同定した SIV 中和抗体誘導群

本研究ではその群を解析する。特に、NAb 誘導に先行し高率に選択された変異体 SIV の B 細胞傷害能を重点的に解明することとした。

3. 研究の方法

上記の背景で見出した SIV 中和抗体高誘導群 (NAb 誘導群) で選択される Nef G63E 変異ウイルス (図 2、変異 A) の病原性とその選択に至る宿主応答を解析し、NAb 非誘導群との差異を次の手順で同定する。

(1) NAb 誘導群における変異選択に至った宿主選択圧 (含 CTL 応答) の解明: 変異選択と関連する宿主応答の有力な候補として、当該領域を含む Nef 特異的 CTL 応答を評価

し、エピトープ同定と拘束 MHC-I アレル検索を行う。

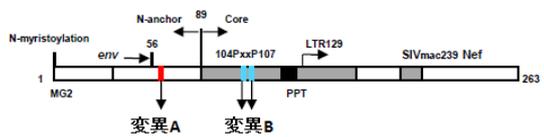


図 2. NAb 誘導群で選択される Nef 変異

(2) NAb 誘導群で選択される変異体 SIV の T 細胞・B 細胞病原性: 新規に作製した Nef G63 変異体 SIV の野生株との病原性の差を、次の 2 段階で試験管内にて比較する。

感染 T 細胞への細胞傷害性・シグナル伝達修飾能を、フローサイトメーターにより解析する。

新規確立した *in vitro* の SIV 感染 T 細胞-B 細胞共培養系を用い、SIV に直接感染しないが Nef 蛋白の侵襲を受けた B 細胞におけるシグナル伝達攪乱と分化障害の様式を評価する。

4. 研究成果

(1) NAb 誘導群において Nef G63E エスケープ変異ウイルス先行選択を生む Nef<sub>62-70</sub> 特異的 CTL の特定

エピトープマッピングの結果、当該 CTL は Nef<sub>62-70</sub> 特異的であり、拘束 MHC class I は Mamu-B\*039:01, B\*004:01, A1\*032:02 の少なくとも 3 種類で promiscuous であった。このエピトープは G2 アンカーを有する、広汎に保存されている型のエピトープであった (Sette A, 2012)。この CTL 応答は NAb 誘導群で感染後 4 カ月までに出現し、慢性期に至るまで維持された。

(2) Nef G63E 変異体ウイルスの Akt 修飾能の発見:

当該変異は SIV 感染細胞において、非常に counterintuitive な細胞死亢進の表現型を呈した。この細胞死亢進は Akt シグナル低下と一対一に対応した (図 3)。

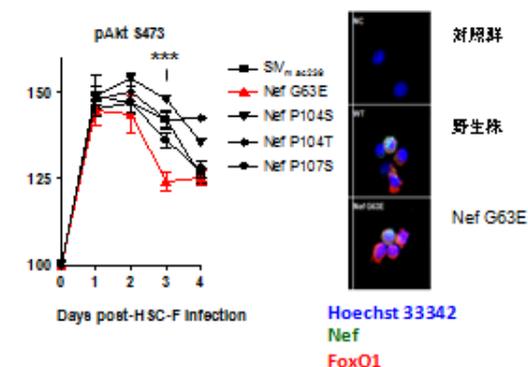


図 3. Nef G63E 変異体の Akt 抑制能

Akt 抑制は、PDK1 制御を受ける Thr308 リ

ン酸化の側に認めなかった一方、mTORC2 制御を MAM-ER で受ける Ser473 リン酸化の側に選択的に認められ、上流刺激誘導依存性の表現型であった。

G63E 変異 Nef 侵入 B 細胞における Akt 抑制のインポート:BCR シグナルを介した B 細胞成熟に主要な負の制御経路である Akt の抑制は Nef 侵入 B 細胞でも再現され、直接的な B cell-intrinsic 制御を Nef が果たす可能性も見出された。

以上から、高度のエイズウイルス中和抗体誘導に最も口バストに結びつく上流イベントが Akt 制御であることを見出した。

#### 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 5 件)

Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8(+) T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model.

*Biochem Biophys Res Commun*. 450:942-947, 2014.

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.072. (査読有)

山本浩之. HIV ワクチン開発への分析的・統合的視点.

ウイルス学会誌 63(2):219-232, 2013. (査読無)

Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of simian immunodeficiency virus replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells.

*J Virol*. 88:425-433, 2014.

doi: 10.1128/JVI.02634-13. (査読有)

Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques.

*PLoS One*. 8:e73453, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0073453. (査読有)

Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. IL-21-producer CD4+ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection.

*Microbes Infect*. 15:697-707, 2013.

doi: 10.1016/j.micinf.2013.06.004. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

Yamamoto H, Matano T. *In vivo* dispositions of SIVmac239-neutralizing antibody induction. NHP symposium 32, 2014 Nov 11-Nov 14, Portland (USA).

Yamamoto H, Matano T. *In vivo* determinants of SIV neutralizing antibody induction. 15<sup>th</sup> Kumamoto AIDS Seminar, 2014 Oct 1-Oct 3, 熊本.

Yamamoto H, Matano T. Selection of a survival signal-modulating CTL escape precedes neutralizing antibody induction against highly resistant SIV. CSHL meeting: Harnessing immunity to prevent and treat disease, 2013 Nov 20-Nov 23, New York (USA).

Yamamoto H, Matano T. A distinct Nef-specific CTL escape selection preceding chronic phase neutralizing antibody induction against highly resistant SIVmac239. AIDS Vaccine 2013, 2013 Oct 7-Oct 10, Barcelona (Spain).

Yamamoto H. Selection of a survival signal-modulating CTL escape mutant precedes SIV neutralizing antibody induction. AIFII12(第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム), 2013年9月10日9月13日、淡路島.

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

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・  
グループ長  
研究者番号：80574615

(2) 研究分担者

なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

( )

研究者番号：