

## 8. 免疫部

部長 高橋 宜聖

### 概要

免疫部は感染症、すなわち、病原体—宿主関係を宿主応答の視点から感染症の制圧研究を推進している。「Translational medical research(橋渡し医学研究)を推進することにより、研究室で得られた研究成果を医療や社会に還元し、健康増進や感染症によるヒトの健康被害の減少」を究極の目標として、部員一同、邁進している。また、国立感染症研究所において、免疫部は感染免疫の学問領域から所内横断的協力体制に加えて、人材育成や国際化に対応するため、研修や国際協力にも参加している。

免疫部では、ウイルス、細菌など、多種多様な病原体感染症に関する研究、生物毒素および抗毒素治療に関する研究、免疫機能に関する研究を実施した。また、品質管理に関する業務、国際協力関係業務、研修業務や共同利用機器管理にも寄与した。

免疫部で実施された研究・業務の概要は以下のとおりである。

#### 調査・研究

##### I. ウイルス感染症

1. ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に関する免疫研究
2. インフルエンザウイルスに関する免疫研究
3. ノロウイルスに関する免疫研究
4. RSウイルスに関する免疫研究
5. 肝炎ウイルスに関する免疫研究
6. その他ウイルスに関する免疫研究

##### II. 細菌感染症

1. 抗酸菌感染症に関する免疫研究
2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する免疫研究

##### III. 免疫機能に関する研究

1. 網羅的な抗体レパトアの研究
2. ヒト化マウスを用いた免疫研究

##### IV. 生物毒素および抗毒素治療に関する研究

1. セアコガクモ毒素中和モノクローナル抗体の研究

#### 品質管理に関する業務

- I. 国家検定
- II. 抜き取り検査
- III. 標準品交付
- IV. 体外診断薬委員会業務

#### 国際協力関係業務

#### 研修業務

#### 共同利用機器管理

令和2年3月31日付で、柴田岳彦第三室主任研究官が

退職した。再任用職員大西和夫主任研究官が任期満了となった。

### 業績

#### 調査・研究

##### I. ウイルス感染症

##### 1. ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に関する免疫研究

##### (1) HIV-1 潜伏化に関する研究

CD4 陽性 T 細胞は HIV-1 の主要な感染標的細胞であり、活性化状態ではウイルスが顕著に増幅される。一方で、静止期状態では潜伏感染リザーバーとして寄与することが知られている。しかしながら、静止期 CD4 陽性 T 細胞は多様な亜集団から構成されているが、実際にどのような亜集団が潜伏感染リザーバーと成り得るかは定かではない。そこで本研究では、健康人末梢血由来の静止期 CD4 陽性 T 細胞を「ナイーブ」、「CCR5-メモリー」、「CCR5+メモリー」の 3 亜集団に分画し、各亜集団におけるリザーバー形成能を評価した。まず、各亜集団について HIV-1 を感染させて静止期維持条件下での培養を施した後、CD3/CD28 を介した活性化処理により誘導される HIV-1 産生を解析した。その結果、CCR5+メモリー亜集団において有意な HIV-1 産生が認められたことから、本細胞集団が主要な潜伏感染リザーバーであると考えられた。

[寺原和孝、岩渕龍太郎(研究生)、竹山春子(早稲田大学)、横田恭子(客員研究員)]

##### (2) 細胞死誘導に関する研究

HIV 感染症において CD4 陽性 T 細胞の減少は最大の病因であるが、この CD4 陽性 T 細胞の減少は感染後期(エイズ発症期)で顕著であるものの、感染初期においても全身レベルで一過性の減少がみられる。しかしながら、感染初期に誘導される細胞死の特徴については不明な点が多い。そこで本研究では、HIV-1 感染初期に誘導される CD4 陽性 T 細胞の細胞死の実態について、ヒト化マウスモデルで解析を行った。その結果、増殖性感染が顕在化する前から細胞死が誘導されることを認めた。この死細胞集団では、活性化型 caspase-3/7 陰性・Annexin V 陰性の非アポトーシス細胞が大半を占めた一方、アポトーシスの誘導促進は認められなかった。このような細胞死誘導と病態形成との関連について、現在解析を進めている。

[寺原和孝、岩渕龍太郎(研究生)、横田恭子(客員研究員)]

##### 2. インフルエンザウイルスに関する免疫研究

##### (1) インフルエンザ交差防御性 B 細胞の新規評価モデルマウスの開発

インフルエンザウイルスへの交差防御能を示す抗体は、認識する抗原領域部位の違いによって抗体の産生過程や

産生細胞の挙動に影響が出ることが予測される。これを詳細に解析するために交差防御性 B 細胞受容体遺伝子をノックインした遺伝子変異マウスを作ることとした。交差防御性抗体の軽鎖遺伝子配列と重鎖 V 領域遺伝子配列をレシピエントの IgM 遺伝子の定常領域前に挿入するプラスミドベクターをデザイン・作製し、ガイド RNA・Cas9 タンパク質とともにレシピエントとなる C57BL/6 受精卵にインジェクションしたところ、目的の遺伝子が挿入された産仔がえられた。また、より多種の交差防御性 B 細胞受容体遺伝子をノックインした B 細胞を得るために *in vitro* での遺伝子導入を検討した。エレクトロポレーション法により目的遺伝子を導入した B 細胞をフィーダー細胞上で培養したところ交差抗体が培養上清中に認められた。遺伝子変異マウスから得られた B 細胞あるいは *in vitro* で遺伝子導入した B 細胞を移植・免疫し免疫反応を解析することで交差防御性メモリー B 細胞の誘導・維持・再活性化に有効なワクチン抗原の評価が可能になることが期待される。

[森山彩野、中野聖太(国立国際医療研究センター)、北村大介(東京理科大学)、岡村匡史(国立国際医療研究センター)、高橋宜聖]

#### (2) インフルエンザウイルスへの交差防御抗体を誘導する新しい抗原剤形に関する研究

インフルエンザウイルス経鼻感染後の肺組織における交差性 B 細胞レパトアの抗原領域を特定し、この領域を露出することで、交差性 B 細胞を誘導しやすいヘマグルチニンタンパク質構造をこれまでに特定している。この同定した交差抗体レパトアの記憶 B 細胞は、多くのヒトに存在し、それらの中には A 型インフルエンザウイルスに極めて広域に結合する抗体クローンが含まれることを明らかとした。これらの結果から、同定したワクチン剤形は、ヒトに交差抗体を惹起可能な新たなワクチン剤型となる可能性が期待される。

[安達悠、登内奎介(研究生)、竹山春子(早稲田大学)、高橋宜聖]

#### (3) カニクイザルを用いた新規インフルエンザワクチン剤形の免疫原性評価

マウスを用いた研究から、改変型インフルエンザヘマグルチニンタンパク質を用いて免疫することで、より効率的に交差防御能を持つ抗体が誘導されることをこれまでに見出している。ヒトへの応用を目指してカニクイザルに改変型インフルエンザヘマグルチニンタンパク質抗原を複数種類のアジュバントとともに免疫したところ、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に対する抗体価の上昇が確認された。

[森山彩野、安達悠、山本拓也(医薬基盤・健康・栄養研究所・客員研究員)、高橋宜聖]

#### (4) 複数のインフルエンザ亜型ウイルスを防御する新規抗体の特定

交差性 B 細胞を誘導しやすいヘマグルチニンタンパク質構造を持つワクチン剤形により誘導される交差抗体レパトアを網羅的に解析するためにシングル B 細胞培養系を用いて、種々の亜型ウイルスに対する結合特性を評価した。その結果、A 型インフルエンザウイルス抗原に広域な結合特性を示し、感染防御能を持つ抗体レパトアを見出した。この抗体レパトアの抗原領域は、既知の交差抗体の抗原

領域とは異なる可能性が示唆されたことから、新規交差抗体であることが期待される。

[登内奎介(研究生)、安達悠、森山彩野、竹山春子(早稲田大学)、高橋宜聖]

### 3. ノロウイルスに関する免疫研究

#### (1) ノロウイルスに対するヒト液性免疫記憶と VLP ワクチンの免疫原性・有効性に関する研究

ノロウイルス感染症は急性感染性胃腸炎の約 90%を占め、ワクチンにより予防が望まれる感染症の1つである。本研究ではヒトノロウイルスに対する液性免疫記憶のフローサイトメトリーによる定量化方法を樹立し、現在開発が進められているヒトノロウイルス VLP ワクチンの有効性をヒト免疫細胞移植マウスにて評価した。その結果、VLP 型ワクチンはその構造依存的により強く IgA 型抗体を誘導することを明らかにし、更にこれらの IgA 型抗体は IgG 型抗体に比してより優れた中和能を示す事を *in vitro* 試験、また感染動物モデルにより明らかにした。

[小野寺大志、橋香奈、片山和彦(北里大学)、三好龍也(堺市衛生研究所)、小林和夫(大阪健康安全基盤研究所・客員研究員)、阿戸学(感染制御部)、高橋宜聖]

#### (2) ノロウイルス次世代ワクチンの開発に向けた交差抗体に関する研究

ヒトノロウイルスは GI, GII, GIV の遺伝子グループから成り、それらは更に数十に上る遺伝子型のウイルスに分類される。次世代型ワクチンとして、これら多岐にわたるウイルス遺伝子型をカバーする次世代ノロウイルスワクチンの開発が望まれている。本研究では次世代ノロウイルスワクチンのターゲットとなり得る、より広範なノロウイルス反応性を有する交差抗体の機能解析を行った。その結果、ノロウイルス感染モデルマウスにおいてヒトノロウイルス GI.1 型, GII.4 型へ交差反応性を有する記憶 B 細胞が誘導される事、さらにそれらの細胞から多数のモノクローナル抗体パネルを作成した。現在、抗体の機能解析を進めている。

[橋香奈、小野寺大志、高橋宜聖]

### 4. RS ウイルスに関する免疫研究

#### (1) RS ウイルス(RSV)感染に伴う二次性細菌感染の免疫学的機構の解明

RSV と細菌の重複感染は、乳児や高齢者において肺炎など重症化をしばしばひき起こす。我々は RSV 感染が誘導する免疫応答に注目し、重症化をもたらす免疫学的機構のひとつを解明した。肺炎球菌感染 1 日後の肺では、RSV との重複感染群の気道への細胞浸潤、炎症性サイトカイン産生、肺炎球菌のクリアランスが肺炎球菌単独感染と比較して抑制された。一方、肺炎球菌感染 6 日後の肺炎球菌単独感染群では炎症応答が終息したのに対して、RSV との重複感染群では強い感染がみられた。重複感染モデルにおいて Gas6 や Axl KO マウスや Axl に対する抗体または阻害剤の投与は、肺炎球菌感染後の初期炎症応答の抑制とそれに続く感染の増大、そして体重や生存率の低下を解消した。骨髄移植実験から、RSV 感染により上皮細胞ではなく、肺泡マクロファージから産生される Gas6 が Axl を介して二次性細菌感染を容易にし、病態の

悪化を招いていることが示唆された。さらにこの Gas6/Axl シグナルは、M2 マクロファージを誘導することにより肺炎球菌感染に伴う IL-18 産生など感染初期の免疫応答を抑制し、結果として NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生など肺炎球菌のクリアランスに重要な応答を阻害することにより強い感染を誘導することが明らかになった。この結果は、Gas6/Axl を標的とした新たな二次性細菌性肺炎などの予防・治療法の開発につながる事が期待される。

[柴田岳彦、牧野愛璃(研究生)、高橋宜聖、阿戸学(感染制御部)]

### (2) RSV 感染に伴う喘息の増悪機構の解明

RSV 感染に伴い喘息の症状が悪化することがある。しかし、この免疫学的機構は明らかになっていない。そこで、イエダニ抗原誘導アレルギーモデルに RSV を感染させたマウス喘息増悪モデルを作製し、その機構の解明を試みた。この増悪グループでは、好中球と単球の増加、matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) の発現上昇がみられた。MMP-12 KO マウスでは、増悪モデルでも気道抵抗値の亢進や好中球数の増加など病態の増悪がみられなかった。すなわち MMP-12 が増悪因子である可能性が示唆された。また、MMP-12 産生は STAT6 の活性化と RSV によって誘導される何らかの分子の活性化により相乗的に誘導されることがわかった。この分子の同定と好中球数増加の機構解明は、RSV 感染に伴う喘息の増悪に対する予防・治療法の開発につながる事が期待される。

[牧野愛璃(研究生)、長安真白(実習生)、柴田岳彦、高橋宜聖]

### (3) RSV G タンパクを標的としたワクチン開発の可能性と重症化機構の解明に向けた研究

これまでの RSV 感染患者の検体を用いた研究から、RSV の中和には RSV の G タンパク抗体も重要である可能性が示唆された。そこで、G タンパク抗体価の高いいくつかの血清から G タンパク抗体を精製しマウスに投与したところ、パリビズマブ(現在使用されている感染予防用モノクローナル抗体)よりも強く防御効果を示すものがあつた。一方、重症患者から精製した G タンパク抗体をマウスに投与すると、RS ウイルス感染に対して防御効果を示すものもあつた。すなわち、乳幼児期の RS ウイルス感染に伴う重症化は抗体以外のその他要素も関与する可能性が示唆された。今後の RSV 感染に伴う重症化メカニズムの解明が、停滞する RSV ワクチン開発のために必要不可欠である。

[柴田岳彦、高橋宜聖、阿戸学(感染制御部)]

## 5. 肝炎ウイルスに関する免疫研究

### (1) A 型・E 型肝炎ウイルスに関する免疫研究

経口感染由来の急性肝炎を起こす病原体として A 型・E 型肝炎ウイルスが知られているが、本研究ではこれらウイルスに特異的なヒト型モノクローナル抗体を作製し、新たな治療法や診断法への応用に繋げることを目的としている。これまで、ウイルス抗原で免疫したマウスやワクチン接種者末梢血から分離した B 細胞を元に抗体遺伝子をクローニングし、組換えヒト IgG を作製した。抗原に対する結合性を ELISA で検証し、A 型・E 型肝炎ウイルスそれぞれに結合する 10 種類以上の抗体を樹立するに至っている。これら抗

体のウイルス中和活性については現在解析中である。

[寺原和孝、安達悠、小野寺大志、松村隆之、村松正道(ウイルス第二部)、浜口功(血液・安全性研究部)、高橋宜聖]

### (2) B 型肝炎ウイルスに関する免疫研究

B 型肝炎ウイルス感染は肝不全や肝がんにつながる恐れがあり予防・治療法の開発が求められる。現在使用されている HBs 抗原ワクチンでは十分な抗体価が誘導されない場合があり、新たなワクチン抗原の開発が望まれる。本研究では既往感染者末梢血由来の B 型肝炎ウイルス抗原認識メモリー B 細胞の検出技術の開発を行うとともに、産生される抗体の感染中和活性を検討した。その結果、B 型肝炎ウイルス感染中和活性を持つ抗体クローンを複数個単離し、それらの抗体遺伝子配列を同定することに成功した。これらの抗体のエピトープ解析を進めることで新たなワクチン抗原の発見につながる可能性が期待される。

[森山彩野、孫琳、橋香奈、小野寺大志、加藤孝宣(ウイルス第二部)、鈴木亮介(ウイルス第二部)、由雄祥代(国立国際医療研究センター)、考藤達哉(国立国際医療研究センター)、高橋宜聖]

## 6. その他ウイルスに関する免疫研究

### (1) ジカウイルスに関する免疫研究

ジカウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルスは、東南アジア地域で共に流行している。そのため、ジカワクチンの開発に向けて、とくに他のフラビウイルスとの液性免疫の交差性に起因した抗体依存性感染増強のリスクを軽減したワクチンの開発研究が必要とされている。本研究では、ジカウイルスと他のフラビウイルスに交差するヒト抗体を網羅的に解析し、交差結合抗体パネルを作成した。そして、中和活性等の有無により複数のグループ分けを行い、今後のワクチン戦略を考える上で参考となる液性免疫に関する情報を収集した。

[Arnong Nithichanon(Khon Kaen 大学、タイ王国)、松村隆之、小野寺大志、林昌宏(ウイルス一部)、鈴木亮介(ウイルス二部)、Ganjana Lertmemongkolchai(Khon Kaen 大学、タイ王国)、高橋宜聖]

### (2) 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)ウイルスに関する免疫研究

B 細胞系リンパ球に感染した SFTSV が壊死性リンパ節炎を起すとともにサイトカイン産生等の過剰な宿主応答を誘導し、多臓器不全へと進展していくという発病機構仮説が考えられる。本研究では SFTS 患者体内の B 細胞および形質芽細胞の特徴を明らかにするために、ヒト組織検体を用いた抗体レパトア解析手法を開発し、次世代シーケンサを用いた網羅的抗体レパトア解析プロトコールにより、抗体レパトア全体像を把握する可視化パイプラインを確立し、抗体 H 鎖と L 鎖の各 CDR3 領域アミノ酸配列の特性を主成分分析により抽出するプロトコールも開発した。SFTSV 患者病理組織における抗体レパトア解析から以下の結果を得た。(1)SFTSV 感染細胞が全身に播種しておらず限局した組織に認められる症例において、ウイルス陽性組織に特徴的な抗体レパトアを同定した。(2)ウイルス感染

細胞が全身に播種している症例において、全身の各組織・器官におけるウイルスゲノム数と抗体レパトア(CDR3 クロノタイプ)出現頻度の相関関係を求める手法を開発し、有意な相関係数を持つレパトアを同定した。(3)これらの抗体レパトアのクロノタイプ(特に CDR3 配列)について主成分分析などを用いて解析し、共通なレパトア特性の抽出を試みた。(4)SFTS 患者組織における全ての抗体可変領域遺伝子配列について組織中の配列出現率と SFTSV ゲノムコピー数との相関を Needleman-Wunch 法により解析する機械計算プログラムを作製した。これにより、患者別に NGS で検出された全ての CDR3 クロノタイプについて個体内組織循環を見ることができ、その SFTSV ゲノムコピー数との相関を判定することができた。これらの結果をまとめると、SFTS 患者体内における SFTSV 陽性大型リンパ芽球では、抗体遺伝子のうち CDR3 領域に疎水性アミノ酸コアと荷電アミノ酸多数を持ついわゆるポリリアクティブ抗体が発現している可能性が高いことが明らかになった。すなわち、ポリリアクティブ(自己反応性)抗体がウイルス感染の発症機構に深く関与することを示唆しており、ウイルス感染症発症過程にこれまでにない全く新しい視点を与える可能性がある。

[大西和夫、鈴木忠樹(感染病理部)、大場靖子(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)、佐野芳(感染病理部)、相内章(感染病理部)、孫琳、薛漢兵(研究生)]

## II. 細菌感染症

### 1. 抗酸菌感染症に関する免疫研究

#### (1) 非結核性抗酸菌感染患者におけるインターフェロン $\gamma$ 自己抗体に関する研究

インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )に対する自己抗体を保有し、IFN- $\gamma$ シグナルを阻害することによって、難治性の播種性非結核性抗酸菌感染症等を発症することが近年問題となっている。特にタイ北東部に於いては患者が多数発生し、播種性 *Mycobacterium abscessus* 感染症の遷延化、再燃が問題となっている。2016年に Linらにより抗 IFN- $\gamma$ 自己抗体の結合するエピトープが IFN- $\gamma$ 分子の C末端であり、そのペプチド配列がアスペルギルス Noc2 タンパクと交差することが報告されたが、当該文献からもエピトープは複数あることが示唆されており、その詳細については不明である。現在我々は、タイ王国における患者検体・情報を解析して、新規エピトープの同定、交差抗原の同定、患者居住区域における原因抗原との接触状況調査による抗 IFN- $\gamma$ 自己抗体産生過程の解明を試みている。また、患者血漿とリコンビナント IFN- $\gamma$ タンパク質を反応させた後に、IFN- $\gamma$ の ELISAを行うといった阻害 ELISA法により、高感度かつ高特異度的に非結核性抗酸菌感染症の診断が行え、さらに非結核性抗酸菌感染症が活動性あるいは非活動性なのか判別可能なことを見出した。[Arnong Nithichanon (Khon Kaen 大学、タイ王国)、松村隆之、阿戸学(感染制御部)、Ganjana Lertmemongkolchai (Khon Kaen 大学、タイ王国)、高橋宜聖]

#### (2) 菌体表層および菌体外構造物に関する研究

電子顕微鏡を用いて抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* の観察を行ったところ、菌体表面に線維状の構造物が観察された。この構造物は形態から pili と推察された。glycopeptidolipids (GPL) 欠損株では菌体表面の

GPL層および pili 様構造物が失われており、pili 様構造物は GPL と同様に sliding や宿主細胞との相互作用に関与する可能性が示唆された。

[川本晃大・難波啓一(大阪大学)、小林和夫(大阪健康安全基盤研究所・客員研究員)、高橋宜聖、大原直也(岡山大学・客員研究員)、阿戸学(感染制御部)]

### 2. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する免疫研究

#### (1) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に対する防御免疫に関する研究

A群レンサ球菌(Group A *Streptococcus*: GAS)は、通常、上気道粘膜もしくは皮膚表面で局所感染を引き起こすが、劇症型溶血性レンサ球菌感染症では急激なショックと菌血症を伴う致死的全身感染となる。これまで、劇症型A群レンサ球菌感染マウスモデルにおいて好中球減少を代償すると考えられたインターフェロン $\gamma$ 産生未熟骨髓系細胞( $\gamma$ IMCs)による宿主防御機構の詳細は不明であった。今回、我々の研究により、血中インターロイキン(IL)-6レベルは、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者の死亡例より生存例において高いこと、感染後期の血中IL-6レベルは非劇症型A群レンサ球菌感染マウスモデルより劇症型感染マウスモデルにおいて高くなること、感染後期のIL-6を抗体により中和すると感染が増悪化すること、感染後期の主要なIL-6産生細胞は $\gamma$ IMCsであることが示された。また、 $\gamma$ IMCsにおいてToll様受容体(TLR)2によるA群レンサ球菌の感知によりIL-6が誘導され、オートクラインおよびパラクラインによって、IL-6が $\gamma$ IMCs上のC型レクチン受容体の一つであるMincleを発現増強させることが示された。さらに、MincleはA群レンサ球菌のリポタイコ酸アンカーを認識する受容体であることや、 $\gamma$ IMCsにおけるMincle発現はマクロファージ等の活性化因子であるIFN- $\gamma$ の産生に必須であることが示された。すなわち、 $\gamma$ IMCsにおけるTLR2とMincleによるA群レンサ球菌のシークエンシャル・センシングによって宿主防御免疫が誘導されることが見出された。本研究により、劇症型A群レンサ球菌感染マウスモデルにおける防御免疫機構の一部が解明された。

[松村隆之、池辺忠義(細菌第一部)、大西真(細菌第一部)、吉澤定子(東邦大学)、山崎晶(大阪大学)、竹山春子(早稲田大学)、高橋宜聖、阿戸学(感染制御部)]

#### (2) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に対する抗体療法に関する研究

劇症型溶血性レンサ球菌感染症の大部分はA群レンサ球菌感染が原因となる。また、劇症型感染を起こしたA群レンサ球菌の約6割には主要な毒素streptolysin O等の産生抑制を解除する遺伝子変異が認められている。今回、ガス壊疽菌群の一種、ウェルシュ菌のパーフリンゴリシンOに結合してその溶血活性を中和するモノクローナル抗体(HS1, HS2, HS3)の中で、HS1がstreptolysin Oを中和し、劇症型A群レンサ球菌感染動物モデルやヒト好中球への感染モデルにおいて治療効果を発揮することが明らかとなった。本研究結果は、抗streptolysin Oモノクローナル抗体が劇症型溶血性レンサ球菌感染症の予防・治療に有効な薬剤である可能性を示している。

[松村隆之、西山紋恵(協力研究員)、相内章(感染病理部)、池辺忠義(細菌第一部)、千葉丈(感染病理部)、

阿戸学(感染制御部)、高橋宜聖]

### III. 免疫機能に関する研究

#### 1. 網羅的な抗体レパトアの研究

次世代シーケンサを用いた網羅的抗体レパトア解析プロトコルの開発改良を行っている。ヒト抗体 H 鎖遺伝子領域の V,D,J 遺伝子断片データベースを充実させ、IgBLAST 法を用いたアノテーションを行い、V(56)、D(27)、J(6)各遺伝子断片の再構成を立体格子上にプロットしてレパトア全体像を可視化する機械計算パイプラインを確立した。また、L 鎖遺伝子領域についても、Vkl(104)、Jkl(7)各遺伝子断片の再構成を2次元マップ上にプロットして把握する可視化パイプラインを確立した。さらに、抗体 H 鎖と L 鎖の各 CDR3 領域アミノ酸配列の特性を主成分分析により抽出するプロトコルも開発した。これにより、マウス個体内で形成される抗体レパトアの発生過程、抗原刺激による抗体レパトア動態力学の全視野的解析、新規抗体分子配列の遺伝子合成による逆遺伝学的発現とウェット実験による抗原結合性確認、レパトア形成におけるプレ B 細胞受容体の役割、などの解析を行っている。また、様々な抗体重鎖と結合することができる「汎用抗体軽鎖」分子の設計・作製を行い、抗体分子発現システムの改良と抗体重鎖・軽鎖の分子間相互作用のメカニズムを解析する実験系を構築した。これらの新規抗体レパトア解析法新は感染における免疫応答解析や新規ワクチン開発などに大きく寄与すると考える。

[大西和夫、孫琳、薛漢兵(研究生)、野口保(東京薬科大学)、藤本浩文(品質管理保証室)、藤博幸(関西学院大学)]

#### 2. ヒト化マウスを用いた免疫研究

ヒト免疫細胞の分化を伴う、いわゆる“ヒト化マウス”はヒト造血系やヒト指向性病原体感染の *in vivo* モデルとして広く用いられている。現在このヒト化マウスを用いて、本研究はリンパ組織で分化した多様なヒト樹状細胞亜集団の同定とその性状・機能解析を進めている。これまでにヒト化マウスリンパ組織にはヒトと同等の性状を示す古典的樹状細胞(cDC; conventional dendritic cell)が存在することが知られているが、今回単球に類似した表面マーカーの発現を伴う cDC 様亜集団を発見した。従来は単球と分類され、cDC には分類されていないこの亜集団では、近年 2 型 cDC(cDC2)のマーカーとして報告された CLEC10A を発現していることが認められた。またヒト化マウス脾臓から単離した本亜集団は抗原の存在下で cDC2 と同程度に CD4 陽性 T 細胞をプライミングする機能を有することを確認した。さらに、RNA-Seq により網羅的に遺伝子発現を解析した結果、cDC2 に類似した遺伝子発現を呈していることに加え、炎症関連の遺伝子発現上昇が認められた。今後は、この亜集団と生体内の炎症反応の関連を明らかにすることで、この亜集団を標的とした新たな炎症制御の手法の開発に繋がることを期待される。

[岩淵龍太郎(研究生)、寺原和孝、竹山春子(早稲田大学)、高橋宜聖、横田恭子(客員研究員)]

### IV. 生物毒素および抗毒素治療に関する研究

#### 1. セアカゴケクモ毒素中和モノクローナル抗体の研究

オーストラリア由来のセアカゴケグモは、1995(平成7)年9月に大阪府で多数発見されて以来、現在では日本国内ほぼ全ての都道府県で観察されており、大きな社会問題となっている。治療は、対症療法とウマ抗毒素の投与であるが、我が国では抗毒素が薬事承認されていないため、製造元であるオーストラリア CSL 社から医師の個人輸入により、ウマ抗毒素の保管・投与が行われているのが実情である。また、ウマ抗毒素の使用はアナフィラキシーの危険が常につきまとうため、別の治療法が望まれている。セアカゴケグモ毒素の主成分は $\alpha$ -ラトロキシンという神経毒であり、これを中和できれば十分な治療効果が上げられると考えられる。そのため、本研究ではウマ抗毒素よりも安全性と有効性の高い治療用の $\alpha$ -ラトロキシン特異的ヒトモノクローナル抗体の作製を進めている。[松村隆之、阿戸学(感染制御部)、高橋宜聖]

### 品質管理に関する業務

#### I. 国家検定

エンドトキシン試験:275ロット

[寺原和孝、小野寺大志、柴田岳彦、道坂瑛(非常勤職員)、高橋宜聖]

#### II. 抜き取り検査

エンドトキシン試験:8ロット

[寺原和孝、小野寺大志、柴田岳彦、道坂瑛(非常勤職員)、高橋宜聖]

#### III. 標準品交付

標準はぶ抗毒素(抗致死、抗出血 I 及び抗出血 II)、はぶ試験毒素(致死)、はぶ試験毒素(出血 I)、はぶ試験毒素(出血 II)、標準まむし抗毒素(抗致死、抗出血)、まむし試験毒素(致死)、まむし試験毒素(出血)

[松村隆之、高橋宜聖]

#### IV. 体外診断薬委員会業務

承認前検査担当項目として、承認申請のあった A 型肝炎ウイルス(HAV)抗体測定用キットについて感度、特異性及び再現性試験を行うことになっている。また、この検査に必要な HAV 抗体国内血清パネルの整備を行う。また体外診断薬委員会に提出された各種体外診断薬の承認前検査申請について審査を行った。

[寺原和孝、高橋宜聖]

#### 1. A 型肝炎ウイルス(HAV)検体パネルの整備

HAV 感染予防対策の基礎となる感染診断法のうち最も多用されるのは HAV 抗体検出キットで、A 型肝炎診断補助検査全体の 95%以上を占める。この HAV 抗体検出キットは数年ごとに感度・特異性の向上したバージョンが開発されるため、新しい HAV 抗体検出キットの継続的な性能評価が必要とされている。免疫部ではその性能評価の基礎となる感染症検体パネル(IgM、IgG 型 HAV 抗体パネル)の整備を進めており、これまで IgG 型 HAV 検体パネルの整備を完了した。一方 IgM 型 HAV 検体については、国立病院機構の肝炎研究班に属する医療機関と、国内の肝炎患診療連携拠点病院に検体の譲渡を依頼し、令和元年度

終了時点で合計 36 検体を収集するに至っている。

[寺原和孝、是永匡紹(国立国際医療研究センター)、八橋弘(国立病院機構長崎医療センター)、高橋宜聖]

## 国際協力関係業務

**I. Khon Kaen 大学(タイ王国)とウイルス・細菌感染症の免疫応答について共同研究を推進し、Khon Kaen 大学の博士号研究員を受け入れ、実験手技と研究の指導にあたった。**[松村隆之、阿戸学(感染制御部)、高橋宜聖]

**II. 蛇毒抗毒素力価試験法について台湾 CDC 技術員の教育研修を依頼され、抗致死価測定と抗出血価測定について実技研修を行った。**[松村隆之、山本明彦(バイオセーフティ管理室)、高橋宜聖]

## 研修業務

### I. 大学など教育機関における講義や研修

早稲田大学先進理工学部(10月5日、10月26日、11月2日、12月14日)で免疫学講義を行った。[高橋宜聖]

早稲田大学先進理工学部(10月28日)で上級生命科学講義を行った。[松村隆之]

東邦大学大学院理学研究科(10月21日、28日)で講義を行った。[柴田岳彦]

筑波大学生命環境学群(9月10-11日ほか)で講義を行った。

筑波大学大学院生命科学研究科(10月29日ほか)で講義を行った。

慶應義塾大学法学部(4月12日、19日ほか)で講義を行った。

[大西和夫]

## 共同利用機器管理

所内・所外の利用者による機器の利用を円滑にするため、機器の使用に関する予約と使用記録を管理・保存した。さらに、機器の定期的な保守、点検を行い、故障等のトラブルには早急に対処した。とくに新規使用者や、特殊な操作法を希望する使用者に関しては、個別に技術指導を行った。令和元年度の使用実績は、835回、1993.2時間であった。

[泉山枝里子(非常勤職員)、小野寺大志、高橋宜聖]

## 広報委員会

広報委員会(広報運営委員会)において、所の広報活動全般(見学研修、Info 対応、所内行事記録、「知の市場」の連絡・会場設営、一般公開等)の企画・運営に参画した。[大西和夫]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1). Ishii H, Terahara K, Nomura T, Takeda A, Okazaki M,

Yamamoto H, Tokusumi T, Shu T, Matano T. A novel immunogen selectively eliciting CD8+ T cells but not CD4+ T cells targeting immunodeficiency virus antigens. **J. Virol.** 2020 Mar 94(8): e01876-19.

2). Saenwongsa W, Nithichanon A, Chittaganpitch M, Buayai K, Kewcharoenwong C, Thumrongwilainet B, Butta P, Palaga T, Takahashi Y, Ato M, Lertmemongkolchai G. Metformin-induced suppression of IFN- $\alpha$  via mTORC1 signalling following seasonal vaccination is associated with impaired antibody responses in type 2 diabetes. **Sci. Rep.** 2020 Feb 24;10(1):3229. doi: 10.1038/s41598-020-60213-0.

3). Onodera T, Hashi K, Shuka RK, Miki M, Takai-Todaka R, Fujimoto A, Kuraoka M, Miyoshi T, Kobayashi K, Hasegawa H, Ato M, Kelsoe G, Katayama K, Takahashi Y. Immune focusing properties of virus-like particle improve protective IgA responses. **J. Immunol.** 2019 Nov 8. pii: ji1900481. doi: 10.4049/jimmunol.1900481.

4). Yamashita Y, Oe T, Kawakami K, Osada-Oka M, Ozeki Y, Terahara K, Yasuda I, Edwards T, Tanaka T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumoto S, Ariyoshi K. CD4+ T responses other than Th1 type are preferentially induced by latency-associated antigens in the state of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Front. Immunol.** 2019 Nov10, 2807.

5). Chu C, Murdock MH, Jing D, Won TH, Chung H, Kressel AM, Tsaava T, Addorisio ME, Putzel GG, Zhou L, Bessman NJ, Yang R, Moriyama S, Parkhurst CH, Li A, Meyer HC, Teng F, Chavan SS, Tracey KJ, Regev A, Schroeder FC, Lee FS, Liston C, Artis D. The intestinal microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. **Nature.** 2019 Oct 574(7779):543-548.

6). Moriyama S and Artis D. Neuronal regulation of group 2 innate lymphoid cells and type 2 inflammation. **Adv. Immunol.** 2019 Sep 143:1-9.

7). Adachi Y, Nithichanon A, Tonouchi K, Kuraoka M, Watanabe A, Shinnakasu R, Asanuma H, Ainai A, Yamamoto T, Ishii KJ, Hasegawa H, Lertmemongkolchai G, Kurosaki T, Ato M, Kelsoe G, Takahashi Y. Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies. **Nat. Commun.** 2019 Aug 28;10(1):3883. doi: 10.1038/s41467-019-11821-6.

8). Yamamoto M, Abe C, Wakinaga S, Sakane K, Yumiketa Y, Taguchi Y, Matsumura T, Ishikawa K, Fujimoto J, Semba K, Miyauchi M, Akiyama T, Inoue J. TRAF6 maintains mammary stem cells and promotes pregnancy-induced mammary epithelial cell expansion. **Commun. Biol.** 2019 Aug 2:292.

9). Xue H, Sun L, Fujimoto H, Suzuki T, Takahashi Y, Ohnishi K. Artificial immunoglobulin light chain with potential to associate with a wide variety of immunoglobulin heavy chains. **Biochem. Biophys.**

- Res. Commun.** 2019 Jul 30;515(3):481-486. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.149. Epub 2019 Jun 2.
- 10). Sara L, Shinnakasu R, Adachi Y, Momota M, Makino-Okamura C, Yamamoto T, Ishii KJ, Fukuyama H, Takahashi Y, Kurosaki T. Requirement for memory B cell activation in protection from heterologous influenza virus reinfection. **Int. Immunol.** 2019 Jun 20. pii: dxz049. doi: 10.1093/intimm/dxz049.
  - 11). Bajic G, Maron MJ, Adachi Y, Onodera T, McCarthy KR, McGee CE, Sempowski GD, Takahashi Y, Kelsoe G, Kuraoka M, Schmidt AG. Influenza antigen engineering focuses immune responses to a subdominant but broadly protective viral epitope. **Cell Host Microbe** 2019 May 14. pii: S1931-3128(19)30206-9. doi: 10.1016/j.chom.2019.04.003.
  - 12). Mahlakoiv T, Flamar AL, Johnston LK, Moriyama S, Putzel GG, Bryce PJ, Artis D. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. **Sci. Immunol.** 4(35). pii: eaax0416.
  - 13). Watanabe A, McCarthy KR, Kuraoka M, Schmidt AG, Adachi Y, Onodera T, Tonouchi K, Caradonna TM, Bajic G, Song S, McGee CE, Sempowski GD, Feng F, Urick P, Kepler TB, Takahashi Y, Harrison SC, Kelsoe G. Antibodies to a conserved influenza head-interface epitope protect by an IgG subtype dependent mechanism. **Cell.** 2019 May 16;177(5):1124-1135.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.048.
  - 14). Yoshizawa S, Matsumura T, Ikebe T, Ichibayashi R, Fukui Y, Satoh T, Tsubota T, Honda M, Ishii Y, Tateda K, Ato M. Streptococcal toxic shock syndrome caused by  $\beta$ -hemolytic streptococci: Clinical features and cytokine and chemokine analyses of 15 cases. **J. Infect. Chemother.** 2019 May 25(5):355-361.
  - 15). Matsumura T, Ikebe T, Arikawa K, Hosokawa M, Aiko M, Iguchi A, Togashi I, Kai S, Ohara S, Ohara N, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Takeyama H, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. Sequential sensing by two distinct pattern recognition receptors directs immature myeloid cells to afford protection against invasive group A streptococcal infection. **Cell Rep.** 2019 Apr 9;27(2):561-571.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.056.
  - 16). Terahara T, Iwabuchi R, Hosokawa M, Nishikawa Y, Takeyama H, Takahashi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. A CCR5+ memory subset within HIV-1-infected primary resting CD4+ T cells is permissive for replication-competent, latently infected viruses in vitro. **BMC Res. Note** 2019 Apr 29;12(1):242. doi: 10.1186/s13104-019-4281-5.
2. 和文発表
- 1). 安達悠, 登内奎介, 高橋宜聖 ウイルス 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. **ウイルス**. 第 69 巻 第 2 号 161-168 ページ (2019 年 12 月発行)
  - 2). 森山彩野.  $\beta 2$  アドレナリン受容体による 2 型自然リンパ球(ILC2)の応答制御. **感染・炎症・免疫**. 第 49 巻 第 2 号 59-60 ページ (2019 年 10 月発行)
  - 3). 森山彩野. 神経系による 2 型自然リンパ球と 2 型炎症応答の制御. **生化学**. 第 91 巻 5 号 711-714 ページ (2019 年 10 月発行)
  - 4). 森山彩野.  $\beta 2$  アドレナリン受容体による 2 型自然リンパ球の応答制御. **医学のあゆみ**. 第 269 巻第 10 号 812-814 ページ (2019 年 6 月発行)
- II. 学会発表
1. 国際学会
    - 1). Nithichanon A, Matsumura T, Onodera T, Matsuda M, Suzuki R, Taniguchi S, Lim CK, Thi LAN, Lertmemongkolchai G, Sadun R, Takahashi Y. 2020. High-throughput analysis of human memory B cells and antibodies against flavivirus E protein in Asia-pacific area. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program's 22nd International Conference On Emerging Infectious Diseases In The Pacific Rim (タイ 2 月)
    - 2). Takahashi Y. 2020. Broadly protective antibodies and vaccines. 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Bangkok, Thailand (タイ 2 月)
    - 3). Ishii H, Terahara K, Nomura T, Tokusumi T, Hironaka T, Shu T, Matano T. 2019. Vaccine-induced Vif-specific CD8+ T cells exert strong suppressive pressure on acute SIV replication post-infection. 10th IAS Conference on HIV Science. (メキシコ 7 月)
    - 4). Moriyama S. 2019 Neuronal regulation of group 2 innate lymphoid cell responses and type 2 inflammation. RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2019. (日本 6 月)
    - 5). Matsumura T, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. 2019. The TLR2/IL-6/Mincle axis in IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells is essential to protect against severe invasive *Streptococcus* infection. The 18th Awaji International Forum on infection and Immunity (日本 9 月)
  2. 国内学会
    - 1). Matsumura T, Yoshizawa S, Ikebe T, Ohnishi M, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. Critical role of sequential sensing in protection against severe invasive streptococcal infection. 第 93 回日本細菌学会総会 (名古屋 2 月)
    - 2). 本田尚子, 佐藤法仁, 中山真彰, 松村隆之, 関塚剛史, 黒田誠, 阿戸学, 小林和夫, 石井孝司, 大原直也 2019. Streptomycin dependent Mycobacterium bovis BCG possessing a 513 cytosine insertion in 16S rRNA gene. 第 93 回日本細菌学会総会 (名古屋 2 月)
    - 3). Takahashi Y. Immunity to immune-evading pathogens. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
    - 4). Iwabuchi R, Terahara K, Takahashi Y, Tsunetsugu-

- Yokota Y. Characterization of human CD14low DC-like cells in lymphoid tissues using a humanized mouse model. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 5). Matsumura T, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. 2019. Sequential sensing by TLR2 and Mincle directs immature myeloid cells to afford protection against severe invasive group A *Streptococcus* infection. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 6). Moriyama S. Neuronal regulation of group 2 innate lymphoid cell responses and type 2 inflammation. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 7). Makino A, Nagata N, Ito T, Takahashi Y, Shibata T. Increased matrix metalloproteinase-12 by respiratory syncytial virus infection leads to the exacerbation of asthma. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 8). Hashi K, Onodera T, Takahashi Y. 2019 Murine norovirus infection elicits cross-group neutralizing antibodies against human norovirus. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 9). Xue H, Ohnishi K. Design of the "Common Light Chain" with potential to associate with a wide variety of heavy chains without losing their antigen specificity. 第 48 回日本免疫学会総会・学術集会 (静岡 12 月)
- 10). 松村隆之. 2019. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるシークエンシャル・センシング機構. 第 18 回微生物研究会「微生物研究の新しい潮流」(東京 11 月)
- 11). 佐藤雄志, 寺原和孝, 岩渕龍太郎, 森川裕子, 横田恭子 ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染初期に誘導される CD4 陽性 T 細胞死の性状解析. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 (東京 10 月)
- 12). 野村拓志, 寺原和孝, 石井洋, 山本浩之, 三浦智行, 俣野哲朗 2019. ワクチン誘導 Gag エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の交差反応性が SIVmac239 感染に与える影響の解析. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 (東京 10 月)
- 13). 松村隆之, 高橋宜聖, 阿戸学 2019. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における宿主防御機構の解析. 第 13 回細菌学若手コロッセウム (宮城 8 月)
- 14). 松村隆之, 山崎晶, 高橋宜聖, 阿戸学 劇症型 A 群レンサ球菌感染症におけるシークエンシャル・センシング機構. 第 31 回微生物シンポジウム (京都 8 月)
- 15). 田原口元子, 滝本一広, 寺原和孝, 岩渕龍太郎, 花木賢一 NOJ マウスから検出された *Pasteurella pneumotropica* の病原性について. 第 66 回日本実験動物学会総会 (福岡 5 月)
- 16). Imai T, Matsumura T, Ato M, Miyamoto T, Yamasaki S, Ohga S. Group A *Streptococcus* regulates host immune responses activated via Mincle by changing its lipoteichoic acid anchor. 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会 (名古屋 4 月)
- 17). Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. The TLR2-IL-6-Mincle axis is essential to protect against severe invasive streptococcal infection. 第 92 回日本細菌学会総会 (札幌 4 月)
- 18). 高橋宜聖 免疫学的根拠に基づいた次世代ワクチンの研究開発 第 15 回肝免疫・ウイルス・フロンティア (京都 4 月)

#### 知的財産権の出願・登録状況

- 1). 松村隆之, 佐藤博子, 千葉丈, 阿戸学, 高橋宜聖 抗体並びに劇症型溶血性レンサ球菌感染症を予防及び／又は治療するための薬剤. 特願 2019-010958