

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14851

研究課題名(和文) エボラ出血熱に対するユニバーサル抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of universal antibody therapy for Ebola hemorrhagic fever

研究代表者

高田 礼人 (Takada, Ayato)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：10292062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスはヒトまたはサルに急性で致死率の高い感染症(エボラ出血熱)をひき起こす。現在見つかっているエボラウイルスは系統学的に5種に分けられており、抗原性が大きく異なっている。本研究では、全てのエボラウイルス種に交差反応性を示す中和抗体の作出方法を検討した。免疫抑制剤であるラパマイシンを投与しながらウイルス様粒子で免疫したマウスあるいはエボラウイルスの表面糖蛋白質遺伝子をゲノム内に組み込んだ増殖性の水疱性口炎ウイルスを感染させたマウスでは、通常のアジュバントを用いた免疫方法よりもエボラウイルス種間交差反応性を示す中和抗体が多く誘導される可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ebola viruses cause severe hemorrhagic fever (Ebola hemorrhagic fever) in humans and nonhuman primates. Five phylogenetically distinct species are currently known in the genus Ebolavirus and the antigenicity among these ebolavirus species is also largely different. This study attempted to establish procedures to induce neutralizing antibodies cross-reactive to all known ebolavirus species. Our data suggest the possibility that cross-reactive neutralizing antibodies can be induced more efficiently in mice immunized with virus-like particles using an immunosuppressive agent (rapamycin) or mice infected with replication competent vesicular stomatitis virus pseudotyped with ebolavirus glycoprotein than in mice immunized with virus-like particles using a standard adjuvant.

研究分野：ウイルス学

キーワード：人獣共通感染症 エボラウイルス フィロウイルス 抗体 治療法

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスは、マールブルグウイルスと共にフィロウイルス科に属し、ヒトまたはサルに急性で致死率の高い感染症(エボラ出血熱)をひき起こす病原体である。現在のところ、マールブルグウイルスは1種のみが知られているのに対し、エボラウイルスは系統的に5種に分けられている(Zaire、Sudan、Tai Forest、Bundibugyo および Reston)。2013-2016年の西アフリカでの流行は、この中でもっとも病原性が高いとされる Zaire エボラウイルスが原因であった。

エボラ出血熱は主に中央アフリカで散発的な流行を繰り返しているが、現在のところ効果的なワクチンあるいは治療薬は実用化されていない。一方、2013-2016年の過去に類を見ない西アフリカにおける大規模なエボラ出血熱の流行とヨーロッパ・アメリカを含めた他国への拡散によって、エボラウイルスに対する予防・治療薬開発の必要性・緊急性が認識され、その開発が急がれるなか、承認薬ながらアメリカで生産された抗体医薬が実際の感染者に使用された。申請者らのグループおよび海外のいくつかの研究グループによるこれまでの研究で、中和抗体を用いた受動免疫が有効である事がエボラ出血熱サルモデルで実証されていたからである。

しかし、抗体療法には大きな課題が残されている。これまでの研究では、エボラウイルスの中で最も病原性の高い Zaire ウイルスが使用されてきたが、エボラウイルス5種の抗原性が大きく異なっているため、これまでに世界中で作出されたモノクローナル抗体の殆どが Zaire ウイルス特異的なのである。実際には、Sudan あるいは Bundibugyo ウイルスによる流行も頻りに報告されているが、これらの異なる種のウイルスには現在開発されている抗体は効果が無い。

2. 研究の目的

一般的に用いられる免疫方法ではエボラウイルス種間交差反応性抗体は殆ど誘導されない。そこで、免疫抑制剤であるラパマイシンがもつ抗体産生細胞に対する作用(ある種のウイルスに特異的な高親和性抗体の産生を阻害し、代わりに他の種のウイルスとの共通エピトープに対する抗体応答を誘発する可能性がある)あるいは水疱性口炎ウイルスなどのベクターを利用して、交差反応性抗体の誘導方法を検討する。

3. 研究の方法

モノクローナル抗体のスクリーニング

ラパマイシンを連続投与しつつウイルス様粒子で複数回免疫したマウスならびに増殖性シュードタイプ Vesicular Stomatitis Virus (VSV)を感染させその4週後にウイルス様粒子で免疫したマウスの脾臓を用いて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出し

た。非増殖性シュードタイプ VSV を用いたウイルス中和試験によってハイブリドーマをスクリーニングした。

競合 ELISA によるエピトープの推定

エボラウイルス様粒子および精製したウイルス表面糖蛋白質(GP)を抗原として 96 穴プレートに固相化した。精製抗体および精製後酵素ラベルした抗体を1次抗体および2次抗体として用いた。

実際のエボラウイルスを用いた感染性中和試験

上記項目1および2で、中和活性が確認された抗体について、実際のエボラウイルスで同様の中和活性が認められるか否かを、全てのエボラウイルス種を用いた focus 形成阻害試験によって確認した。

ヒトマウスキメラ抗体の作出

エボラウイルス種間交差反応性中和抗体を産生するマウスのハイブリドーマから RNA を抽出後 RASE 法によりマウス抗体価編領域の cDNA を L 鎖、H 鎖それぞれ作成し塩基配列を決定した後、ヒト IgG1 定常領域を連結し、キメラ抗体として発現させる一つのベクターに抗体遺伝子を組み込んだ。

4. 研究成果

まず最初に、ウイルス蛋白質抗原(ウイルス様粒子)を通常のアジュバントと共に用いた免疫法を試みた。しかし、エボラウイルス種間交差反応性モノクローナル中和抗体が得られなかった。ラパマイシンの投与によって、交差反応性抗体の産生がやや増える傾向にあったが、交差反応性を有するモノクローナル中和抗体は得られなかった。そこで、別の免疫法を試みた。すなわち、エボラウイルス(Zaire 種)の表面糖蛋白質(GP)の遺伝子をゲノム内に組み込んだ増殖性の水疱性口炎ウイルスを用いた。本ウイルスを経鼻的にマウスに感染させるとエボラウイルス GP に対する抗体が誘導された。マウスが回復して数週間後にエボラウイルス(Sudan species)の GP を持つウイルス様粒子の腹腔内投与でブーストする免疫手法を試みた。その結果、誘導される抗体産生細胞の中にはザイルウイルスに対する抗体を産生するものとともに、複数のエボラウイルス種に反応する抗体を産生するものも誘導される可能性が明らかとなった。また、一部の抗体はマールブルグウイルスにも交差する可能性が示唆された。

そこで、この方法によって免疫したマウスの脾臓細胞を用いて、ミエロマ細胞と融合させ、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの確立を試みた。その結果、数クローンの中和抗体が得られた。そのうち2クローン(GP1E8/9 および GP6H11/10)は Zaire species を含めた数種のエボラウイルスに対して反

応性を示した（マールブルグウイルスには交差せず）。面白い事に、1 クロームは（GP7B12/8）全てのエボラウイルス種およびマールブルグウイルスに対して中和活性を示した（図1）。

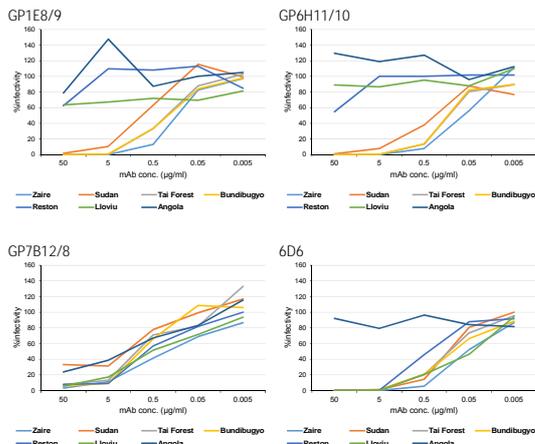


図1 モノクローナル抗体の中和活性

競合 ELISA によって、それぞれの抗体のエピトープを解析した結果（図2）、数種のエボラウイルスに対して反応性を示した2種類の抗体（GP1E8/9 および GP6H11/10）はいずれも既存の交差反応性抗体（6D6）とオーバーラップするエピトープを認識する事が判明した。一方、全てのエボラウイルス種およびマールブルグウイルスに対して中和活性を示した抗体（GP7B12/8）は、実際のエボラウイルスの感染(in vitro)においても中和活性を示し、かつ他のいずれの抗体ともエピトープを競合しなかった。しかし、この抗体はIgMであったため、可変領域の遺伝子を解読し、ヒト-マウスキメラ抗体を作出したところ、中和活性の低下がみられた。

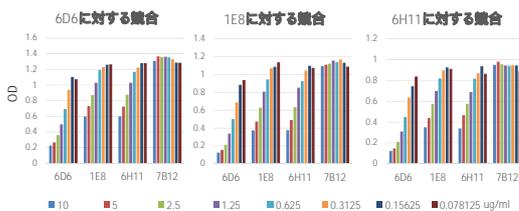


図2 交差反応性抗体の競合ELISA

エボラウイルスに対する抗体療法に関するこれまでの研究で、1種類の抗体の単独投与では効果が期待できず、複数の抗体のカクテルを使用する必要がある事が示されている。恐らく、異なる機能（中和活性、抗体依存性細胞障害活性など）を持つ抗体のカクテルが必要と思われる。したがって、交差中和活性を示す複数の抗体のカクテルが理想である。そのような複数の抗体によるカクテル療法は、エボラ出血熱に対するユニバーサル抗体療法のシーズとなるであろう。また、それらの抗体は高度に保存されたエピトープを認識していると考えられ、未知のエボラウイルスにも効果が期待できる。さらに、マールブルグウイルスにも反応する抗体が得ら

れば、全てのフィロウイルス感染症に対応できる抗体療法も可能かもしれない。

本研究では、抗体のレパートリーに影響を与える可能性がある免疫抑制剤の投与によって、通常の免疫方法では誘導されにくいエピトープに対するモノクローナル抗体の作出を試みた。この方法が確立されれば、ウイルス間の抗原性の違いがワクチン開発や抗体療法の開発の妨げになっているウイルス感染症一般に応用できると考えられる。

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9件)

1. 高田礼人. 感染症 現状の問題点と未来への展望 エボラ出血熱. 臨床と微生物 45(2): 165-169, 2017. (査読無)
2. 高田礼人. エボラ出血熱. 小児科臨床 70(増刊号): 2308(212)-2317(221), 2017. (査読無)
3. 古山若呼, 吉田玲子, 五十嵐学, 高田礼人. エボラ出血熱に対する治療法および診断法の開発. 化学療法の領域. 33(5): 148-155, 2017. (査読無)
4. 高田礼人. エボラ出血熱の診断・治療法開発 ―モノクローナル抗体の活用―. 日本臨床 74(12): 2080-2085, 2016. (査読無)
5. 高田礼人. グローバル感染症最前線 - NTDs の先へ エボラウイルス研究の現状と最新の知見. 医学の歩み. 258(7-8): 803-810, 2016. (査読無)
6. 古山若呼, 高田礼人. エボラ出血熱の予防・治療・診断法開発の現状. ウイルス 66(1): 63-72, 2016. (査読無)
7. Furuyama W, Miyamoto H, Yoshida R, Takada A. Quantification of Filovirus Glycoprotein-Specific Antibodies. Methods Mol Biol. 2017;1628:309-320. doi: 10.1007/978-1-4939-7116-9_25. (査読有)
8. Furuyama W, Marzi A, Carmody AB, Maruyama J, Kuroda M, Miyamoto H, Nanbo A, Manzoor R, Yoshida R, Igarashi M, Feldmann H, Takada A. Fcγ-receptor IIa-mediated Src Signaling Pathway Is Essential for the Antibody-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection. PLoS Pathog. 2016 Dec 30;12(12):e1006139. doi: 10.1371/journal.ppat.1006139. (査読有)
9. Furuyama W, Marzi A, Nanbo A, Haddock E, Maruyama J, Miyamoto H, Igarashi M, Yoshida R, Noyori O, Feldmann H, Takada A. Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy. Sci Rep. 2016 Feb 10;6:20514. doi: 10.1038/srep20514. (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

1. 高田礼人. 第66回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 京王プラザホテル, 東京都, 2017年11月1日.
2. Erica Saphire, Ayato Takada, et al. Antibodies against Ebola, Marburg and Lassa - a global collaboration and structural illumination. 9th International Symposium on Filoviruses. 9th International Symposium on Filoviruses. Welcome Hotel Marburg, Marburg, 2017年9月13日.
3. Ayato Takada. Ebolavirus --Ecology and antiviral strategies--. 11th Annual Meeting of Korean Society of Zoonosis. Korea University, Seoul, 2017年5月19日.
4. Ayato Takada. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Ebolavirus. 札幌コンベンションセンター, 札幌市, 2016年10月25日.
5. Wakako Furuyama, Andrea Marzi, Asuka Nanbo, Elaine Haddock, Junki Maruyama, Hiroko Miyamoto, Manabu Igarashi, Reiko Yoshida, Osamu Noyori, Heinz Feldmann, Ayato Takada. Generation of a cross-neutralizing monoclonal antibody against all known ebolavirus species. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2016年10月23日.
6. Ayato Takada. Ebolavirus Entry into Cells --- Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement---. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 2016年9月9日.
7. Ayato Takada. A Monoclonal Antibody Neutralizing All Known Ebola Viruses. 2016 US-Japan Annual Medical Biodefense Research Symposium Theme: "Ebola And Emerging Pathogens", NIAID, NIH, ROCKVILLE, MARYLAND, 2016年1月14日.
8. 高田礼人. フィロウィルスの細胞侵入機構. 平成27年度 遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌. 北海道大学医学部 学友会館「フラテ」ホール, 札幌市, 2015年12月18日.
9. Ayato Takada. Ebolavirus: ecology and antiviral strategies. 3rd GRF One Health Summit 2015. Davos Congress Centre, Davos, 2015年10月5日.
10. 高田礼人. エボラウイルスとは. 第15回日本ハ-イオセーフティ学会総会. 戸山サンライズ, 東京都, 2015年9月15日.
11. 高田礼人. エボラ出血熱. 第62回日本実験動物学会総会. 京都テルサ, 京都市, 2015年5月28日.
12. 高田礼人. フィロウィルス研究の現状と展望. 第33回川内カンファレンス. 大塚製薬株式会社 能力開発研究所, 徳島市,

2015年4月30日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 礼人 (Takada, Ayato)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号: 10292062

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし