

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08018

研究課題名(和文) インフルエンザ治療を目指した新規モノクローナル抗体作出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel monoclonal antibody production method for influenza treatment

研究代表者

村本 裕紀子 (MURAMOTO, Yukiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特別研究員(RPD)

研究者番号：70436567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した治療薬である。本研究では、抗体医薬品として、全てのA型インフルエンザの治療に利用可能なモノクローナル抗体の作出法を確立することを目的とした。抗体作出方法として、マウスの免疫方法、抗体産生ハイブリドーマの作出方法、加えて、スクリーニング方法についても様々な方法を検討しながら抗体作出を進めた結果、複数のHA亜型を認識する抗インフルエンザウイルス抗体産生ハイブリドーマを作出できた。つまり、複数のHA亜型を認識する抗体作出に適した方法を見出すことができた。本手法はウイルス性感染症治療用抗体の作出法となると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した、副作用の少ない効果的な治療法として、がん、免疫炎症性疾患、感染症、その他の分野で利用されている。しかしインフルエンザの治療法としては未だ実用化されていない。インフルエンザウイルスの主要抗原HA蛋白質の抗原性がH1からH18までのHA亜型により、大きく異なることが大きな障害となっている。そこで本研究では、全てのHA亜型を認識する抗体の作出に適した方法を探索した。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic antibodies utilizes the specificity of one monoclonal antibody to recognize one antigen. The aim of the study is to establish a method to establish monoclonal antibodies that can treat all influenza A virus infections. To that end, several methods of immunizing mice, several fusion methods, and some screening methods to detect antibody-producing hybridomas were performed, and finally, monoclonal antibodies which recognize multiple HA subtypes were established. That is, we have found a suitable method for producing antibodies that recognize multiple HA subtypes of influenza A virus. This method can also be applied to establish antibodies for the treatment of other viral infections.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス

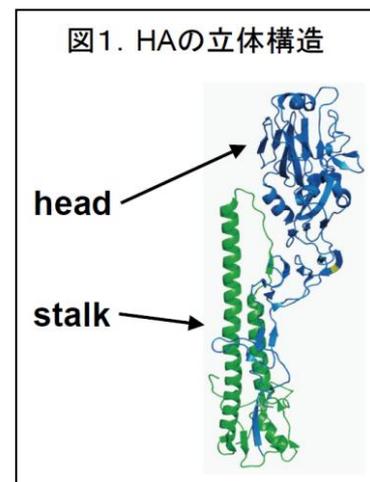
1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスはウイルス表面の糖蛋白質 HA と NA の血清型により、H1 から H18 まで、N1 から N11 までに分類される。そのうちヒトでは H1N1 と H3N2 亜型のウイルスが毎年冬に流行し、患者に呼吸器疾患や全身性の疾患を引き起こす。さらに、歴史的には 10 年から 50 年間隔で、鳥などのインフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスのリアソートメント（遺伝子再集合）により、それまでヒトで流行していなかった HA 亜型のウイルス（新型インフルエンザウイルス）が発生してヒトに感染するようになり、パンデミックを引き起こしてきた。現在、H5N1 亜型や H7N9 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスや、H5N6、H10N8 などの鳥インフルエンザウイルスが散発的にヒトに感染して致死率の高いインフルエンザを引き起こしており、新型インフルエンザの発生が危ぶまれている。

インフルエンザの治療にはウイルス表面に存在する M2 蛋白質や NA 蛋白質の阻害薬が使用されてきた。しかし、これらの薬剤に対して耐性を示すインフルエンザウイルスが出現している。M2 阻害薬に対する耐性ウイルスはすでに世界中に蔓延しており、M2 阻害薬は日本では治療のために使用されることはなくなった。また、現在治療に用いられている NA 阻害薬に対する耐性ウイルスも散発的に出現しているが、2009 年には耐性ウイルスが世界的に流行し、大きな問題となった。したがって、M2、NA 以外のウイルス蛋白質に作用する新規の抗インフルエンザ薬を開発する必要がある。

抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した、副作用の少ない効果的な治療薬として注目されているが、インフルエンザの治療法としては未だ実用化されていない。インフルエンザウイルスの主要抗原である HA 蛋白質の抗原性が、その HA 亜型により、さらに同一亜型内でも、大きく異なることが抗体医薬品開発の障害となる。

HA は、血清型の違いにより、H1 から H18 までの HA 亜型に分類される。HA は I 型の膜蛋白質であり、細胞外領域は球状の head 領域と棒状の stalk 領域からなる（図 1）。HA はインフルエンザウイルスに対する液性免疫の主要ターゲットであり、インフルエンザウイルスの感染またはワクチン接種により、主に HA の head 領域に対する抗体が作られる。HA は免疫システムから逃れるために変異を重ねた結果、その抗原性が変化する。



一方、これまでにわずかではあるが、複数の亜型の HA を中和するモノクローナル抗体が、ワクチンを接種したヒトのメモリーB細胞・形質細胞や免疫したマウスから分離されている（Okuno et al. J Virol. 1993; Throsby et al. PLoS ONE, 2008; Sui et al. Nat Struct Mol Biol. 2009; Corti et al. J Clin Invest. 2010; Wrarmert et al. J Exp Med. 2011; Li et al. PNAS, 2012）。さらに、全ての（H1-H16）を認識し、調べた全ての HA を中和するモノクローナル抗体が1クローン分離されたと報告された（Corti et al. Science, 2011）。これらのモノクローナル抗体は HA の stalk 領域を認識していた。したがって、HA 亜型間で高度に保存された領域である stalk 領域を免疫することにより、全ての HA を中和するモノクローナル抗体を作出することが可能なのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マウスにさまざまな方法で免疫を行い、マウスリンパ球を用いてモノクローナル抗体を多数作出した後、抗体のスクリーニング方法、抗体の親和性、認識するインフルエンザウイルス HA 亜型の数、作出できたモノクローナル抗体の総数などを比較することにより、治療用に利用できるような高親和性、かつ、全ての HA 亜型のインフルエンザウイルス HA 蛋白質を中和するような広域親和性を示すモノクローナル抗体を作出する方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、精製インフルエンザウイルス粒子、精製 HA 蛋白質およびリコンビナント HA の一部領域を抗原として準備した。マウスに4種類の方法により免疫を施した後、免疫マウスから血清を採取し、血清中の抗体価を ELISA 法により調べ、マウスの免疫状態を確認した。そのマウスの脾臓からリンパ球を採取し、リンパ球とミエローマ細胞のフュージョンを3種類

の手法により行った。得られたハイブリドーマの培養上清に目的の抗体が含まれているかどうかを4種類の手法によりスクリーニングした。その後、全てのHA亜型に対して、HA発現細胞を用いた間接蛍光抗体法を行い、モノクローナル抗体が認識する全てのHA亜型を同定した。以上により作出できたモノクローナル抗体を比較することにより、高親和性、かつ、全てのHA亜型のインフルエンザウイルスHA蛋白質を認識するような広域親和性を示すモノクローナル抗体を作出する方法とした。

4. 研究成果

まず、HA蛋白質保存領域を有する免疫源を準備し、マウスに工夫した免疫法を施した。免疫方法の比較をするために、同じ免疫源を通常の免疫方法で免疫した比較群も準備した。それからマウス群の血清中の抗体価を調べたところ、工夫した免疫法を施したマウスの抗体価が、通常免疫群と比べて非常に高いことがわかった。つまり本免疫法は通常の免疫方法よりも高度に免疫を賦与できることが分かった。そのマウスのリンパ球とミエローマ細胞とのフュージョンを行い、ハイブリドーマの作出を試みたが、最初のフュージョン時には、スクリーニングがうまく機能せず、抗体産生ハイブリドーマを選別できなかった。そこで同群の別マウスを用いて再度フュージョンを行い、別のスクリーニング方法を試したところ、さまざまな抗インフルエンザウイルス抗体産生陽性ハイブリドーマを選別できるように修正できた。つまり、免疫方法を工夫するだけでなく、スクリーニング方法も工夫する必要があることがわかった。

そこで再度、マウスに同免疫源を工夫した免疫法で免疫し、マウス血清中の抗体価を調べたところ、通常免疫群と比べて非常に高いことが確認できた。そのマウスのリンパ球からハイブリドーマの作出を試み、スクリーニングにより抗インフルエンザウイルス抗体産生ハイブリドーマを選別できたが、多数のHA亜型を認識する抗体は作出できなかった。

次に、別の免疫源を用いてマウスに免疫した。マウスの抗体価は非常に抗体価が高いことが確認できたため、そのマウスのリンパ球も用いて、これまでとは異なる方法でフュージョンを行ったところ、作出できたハイブリドーマ数が各段に多くなった。そして複数のHA亜型を認識する高親和性の抗インフルエンザウイルス抗体産生ハイブリドーマを選別できた。

そして最後に、別の免疫源と免疫手法を使ってマウスを免疫し、さらにまた別の方法でフュージョンを行ったところ、これまで以上に非常に多くのハイブリドーマを作出できた。H1亜型とH3亜型を用いたスクリーニングを行ったところ、H1亜型とH3亜型の両方のHAを認識するハイブリドーマを8クローン選別することができた。そのうち、両方に対して非常に高い親和性を示すハイブリドーマの性状解析を進めた。全てのHA亜型について、それぞれHA発現細胞を用いた間接蛍光抗体法を行ったところ、他のHA亜型をも認識することが分かった。つまり、複数のHA亜型を認識する抗体を作製するのに適した免疫方法を見出すことができたと言える。現在、これらのモノクローナル抗体の性状解析を進めるとともに、別の病原性ウイルスに対する抗体作出を進めており、これらにより、本手法がウイルス感染症治療用に利用可能なモノクローナル抗体の作出法となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Noda T, Murakami S, Nakatsu S, Imai H, Muramoto Y, Shindo K, Sagara H, Kawaoka Y. Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nature Communications*. 9:59. 2018. DOI: 10.1038/s41467-017-02517-w. 査読有

2) Yamagata Y, Muramoto Y, Miyamoto S, Shindo K, Nakano M, Noda T. Generation of a purely clonal defective interfering influenza virus. *Microbiology and Immunology*. *In press*.

[学会発表] (計 16 件)

1) 村本裕紀子, 川上英良, 武長徹, 神道慶子, 野田岳志. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染の重症化には感染初期の転写因子活性抑制が関与する. 6th Negative Strand Virus–Japan. 2017. Okinawa.

2) 武長徹, 村本裕紀子, 井上浄, 野田岳志. ラッサウイルス感染を中和するモノクローナル抗体の作出. 6th Negative Strand Virus–Japan. 2017. Okinawa.

- 3) Takeshi Noda, Shin Murakami, Hirotaka Imai, Sumiho Nakatsu, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Hiroshi Sagara, Yoshihiro Kawaoka. Seven-segment influenza A virus packages eight ribonucleoprotein complexes. 27th Annual Meeting of the Society for Virology, Marburg Germany. 2017.
- 4) Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions. The 24th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Ohtsu. 2017.
- 5) Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2017.
- 6) Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions. The 16th International Student Seminar. Kyoto. 2017.
- 7) 宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志. インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析. 第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 神奈川. 2017.
- 8) 宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志. インフルエンザウイルスの HA 分節の取込みに重要なゲノム RNA 間相互作用. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 鹿児島. 2017.
- 9) Masahiro Nakano, Keiko Shindo, Yukihiro Sugita, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka, Matthias Wolf, Takeshi Noda. Ultrastructure of the influenza virus ribonucleoprotein complexes producing viral RNAs. Negative Strand Virus 2018. Italy. 2018.
- 10) Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L. Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. The vRNA-vRNA interactions important for HA vRNA packaging of the influenza A virus. Negative Strand Virus 2018. Italy. 2018.
- 11) 宮本翔、田村涼馬、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志. インフルエンザウイルス NP の核小体局在とその意義の解明. 第 20 回日本 RNA 学会年会. 大阪. 2018.
- 12) 宮本翔、田村涼馬、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志. 核小体局在するインフルエンザウイルス蛋白質の同定. 第 161 回日本獣医学会学術集会. つくば. 2018.
- 13) Yutaro Yamagata, Yukiko Muramoto, Sho Miyamoto, Keiko Shindo, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. Cell culture-based generation of a clonal defective interfering influenza virus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 2018.
- 14) Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Jing Shih Wei, Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Thomas Strecker, Takeshi Noda. Mammarenavirus matrix proteins are localized to cis- and trans-Golgi apparatus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 2018.
- 15) Sho Miyamoto, Ryoma Tamura, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. Identification of influenza virus proteins localized in the nucleolus of virus-infected cells. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 2018.
- 16) Masahiro Nakano, Syo Miyamoto, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Association of the influenza A virus NS1 with dsRNA produced by the ribonucleoprotein complex in vitro. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 2018.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。