

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09943

研究課題名(和文) VHH抗体を用いた次世代インフルエンザウイルス高度交差反応性抗体の創出

研究課題名(英文) Development of the next generation anti-influenza virus VHH antibody with high cross-reactivity

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40323703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは変異しやすいため、それらに対応可能な中和抗体が開発できれば非常に有用である。本研究では、ラクダ科動物VHH抗体の特性に着目して、幅広いインフルエンザウイルスに対して有効な中和抗体の作製を試みた。その結果、A(H1N1)pdm09とA(H1N1)の両方を強く中和することができ、VHH中和抗体を取得することができた。この抗体は、細胞実験だけでなく、動物実験においても2種類の異なるウイルスに対して有効であった。本抗体は、インフルエンザの治療薬として応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスは非常に変異しやすい性質を持っているため、抗ウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現が問題となる。本研究では、インフルエンザウイルスの保存性が高い領域を標的とし、幅広いウイルスを中和できるVHH抗体の開発を試みた。このVHH抗体は、構造的にかなり異なるA(H1N1)pdm09ウイルスとA(H1N1)ウイルスの両方を強く中和することができたことから、幅広いウイルスに対応可能な抗体であると考えられる。また、異なるウイルスで保存され、変化しにくい領域に作用することから、変異に対しても強い中和抗体であると期待できる。本抗体はインフルエンザによる健康被害の低減に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Influenza viruses easily change their genomes and it would be valuable to develop an antibody that can neutralize a wide variety of influenza viruses. In this research, based on the property of camelid VHH antibodies, we attempted to develop effective VHH antibodies against a broad range of influenza viruses. As a result, a VHH antibody was obtained that could strongly neutralize both A(H1N1)pdm09 and A(H1N1) viruses. This VHH antibody was effective not only in cell experiments but also in animal experiments against A(H1N1)pdm09 and A(H1N1) viruses. This VHH antibody was suggested to be applicable as a therapeutic drug for influenza.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ インフルエンザウイルス 中和抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、人類が最も警戒しなければならない感染症の1つである。毎年の季節性インフルエンザの流行に加え、高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスや鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのヒトへの感染が報告されており、これらのウイルスから新型インフルエンザウイルスが出現することが危惧されている。さらに、A(H10N8)ウイルスや A(H7N7)ウイルスでもヒト死亡例が報告されており、これらに対しても警戒が必要である。どの亜型から新型インフルエンザが発生するかを正確に予測することは困難であり、幅広い亜型のインフルエンザウイルスに対応可能な予防法・治療法の確立が求められている。

近年、インフルエンザウイルスの中和抗体に関する研究が進展する中で、亜型を超えてウイルスの感染を阻害できる中和抗体や、グループ1(H1, H5 など)とグループ2(H3, H7 など)の壁を越えて感染を阻害できる中和抗体についての報告がなされてきた。これらの亜型間交差反応性抗体は、広い範囲のウイルスをカバーできることから、季節性インフルエンザと新型インフルエンザの備えとして有望と思われるが、これらの抗体はステム領域を認識するため、構造的に標的部位に接近しにくく、ヘッド領域を認識する抗体に比べて活性が低いという問題点がある。治療用抗体として使用するとコストが非常に高いことも課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ステム領域に接近しやすく低コストで製造可能な高交差反応性抗体を作成するため、ラクダ科動物の VHH 抗体技術を基盤としたインフルエンザウイルス広域中和抗体を開発することである。

ラクダ科動物は、H鎖のみで構成される抗体(重鎖抗体)を持っていることが知られ、その可変領域は VHH 抗体 (Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody) と呼ばれている。VHH 抗体はシングルドメイン抗体であるため、分子量が 15kDa と非常に小さく、ヘマグルチニンの根元に近い標的部位にもアクセスが容易だと考えられる。また分子量が小さいため、大腸菌を用いて低コストでの生産が可能である。

### 3. 研究の方法

A(H1N1)pdm09 のリコンビナント HA をバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて作製し、それに結合する VHH 抗体提示ファージを選択した。VHH 抗体配列を大腸菌発現系に組み替えて、HA 結合 VHH 抗体クローンを取得し、交差反応性抗体の候補とした。候補抗体の他の亜型の HA への結合性を評価するとともに、候補抗体について A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)株、A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)株を用いて中和活性の評価、交差反応性の評価を行った。様々な濃度の VHH 抗体の存在下で、これらのインフルエンザウイルスを MOI 0.01 で MDCK 細胞に感染させ、50%抑制濃度を取得した。

さらに、マウスを用いた A(H1N1)pdm09、A(H1N1)ウイルス感染モデルにより、VHH 抗体の有効性、交差反応性を評価した。

また、臨床分離株に対する抗ウイルス活性の測定を見据えて、臨床検体からウイルスを分離する際に使用する細胞の差異が、分離ウイルス株の性状にどのような影響を与えるかについて解析した。

### 4. 研究成果

バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて、A(H1N1)pdm09 のリコンビナント HA を作成し、それに結合する VHH 抗体提示ファージをバイオパニング法によって選択した。選択された VHH 抗体配列を、大腸菌発現ベクターに組み替え、大腸菌にて VHH 抗体を発現・精製した。この段階で、取得できた VHH 抗体は 54 クローンであった。これらの候補抗体について、A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)株、A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)株を用いて中和活性の評価を行ったところ、両方のウイルス株の増殖を抑制できる抗体が、2 クローン取得できた。さらに、様々な濃度の VHH 抗体存在下で、MOI=0.01 の条件で2種類のウイルスを別々に感染させ、50%抑制濃度 (EC<sub>50</sub>) を測定したところ、最も高い抑制効果を示した VHH#23 においては、A(H1N1)pdm09 に対して EC<sub>50</sub>=1.867 ng/ml、A(H1N1)に対して EC<sub>50</sub>=6.138 ng/ml であった。以上のことから、VHH#23 は、A(H1N1)pdm09 と A(H1N1)という幅広いウイルスに対して、非常に高い中和活性を有することが明らかとなった。

in vitro の評価系で効果の高い VHH 抗体の取得が確認できたことから、続いてマウスを用いた A(H1N1)pdm09 ウイルス感染モデル、及び A(H1N1)ウイルス感染モデルにより、VHH 抗体の有効性、交差反応性の評価を行った。抗体投与群とコントロール群で感染後のマウス生存率を比較したところ、A(H1N1)pdm09 感染では VHH 抗体 200 µg 投与群で 75%が生存、50 µg 投与群では 50%が生存 (コントロール群では 0%が生存) した (Fig. 1)。また、A(H1N1)感染では VHH 抗体 200 µg 投与群で 100%が生存、50 µg 投与群で 75%が生存 (コントロール群では 0%が生存) した (Fig. 2)。以上のことから、この VHH 抗体は、A(H1N1)pdm09 と A(H1N1)

という異なるウイルスに対して、感染防御効果を持つことが示唆された。

さらに、臨床分離株に対する抗ウイルス活性の測定を想定して、臨床検体からウイルスを分離する際に使用する細胞の差異と分離ウイルス株の性状の関連について解析した。MDCK 細胞-1( 附着培養系) と MDCK 細胞-2 ( 浮遊培養系) を用いて、臨床検体から A(H1N1)pdm09 ウイルスの分離・継代を行なったところ、MDCK 細胞-1 では抗原性の変化を伴う変異が高率に導入される一方で、MDCK 細胞-2 ではそのような変異の導入率が低いことが明らかとなった。

本研究で取得した VHH 抗体は、構造的にかなり異なる A(H1N1)pdm09 ウイルスと A(H1N1) ウイルスの両方を強く中和することができたことから、幅広いウイルスに対応可能な抗体であると考えられる。また、異なるウイルスで保存され、変化しにくい領域に作用することから、変異に対しても強い中和抗体であると期待できる。

通常の IgG による中和抗体は、分子量が 170kDa と大きいため、交差反応性中和抗体の標的となるステム領域にアクセスするにはやや困難が伴うと考えられる。また、抗体医薬は一般的に製造コストが高いことが知られており、この点も解決することが望ましい。それに対して VHH 抗体は、シングルドメイン抗体であるため分子量が 15kDa と非常に小さく、ヘマグルチニンのステム領域にも容易にアクセス可能と推測される。また分子量が小さくシングルドメインからなるため、大腸菌による低コスト生産が可能である。

本研究で特定された VHH 抗体は、幅広いインフルエンザウイルスに対して有効であり、しかも低コストでの製造が可能であることから、インフルエンザによる健康被害の低減に役立つものと考えられる。

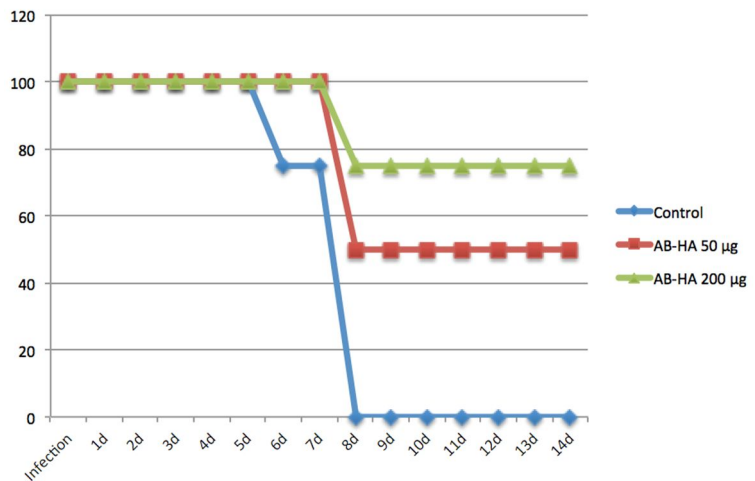


Fig. 1 A(H1N1)pdm09 ウイルス感染マウスモデルによる VHH 抗体の感染防御効果の評価

縦軸はマウスの生存率、横軸は感染後の日数を表す。VHH 抗体の投与量が多いほど、マウスの生存率が高いという結果であった。

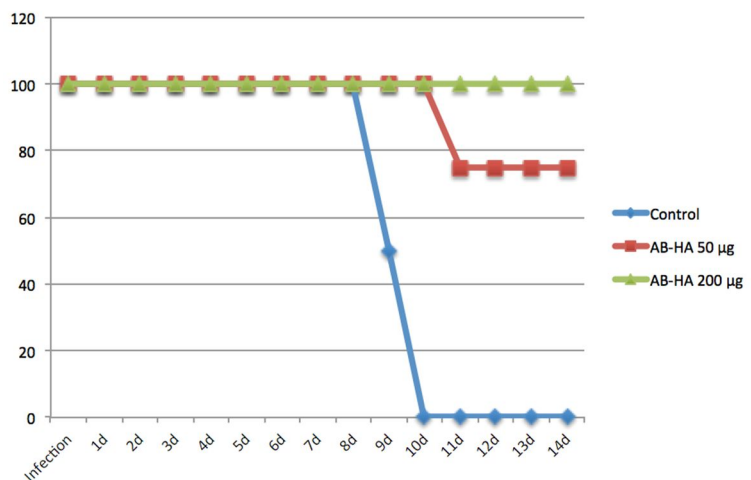


Fig. 2 A(H1N1)ウイルス感染マウスモデルによる VHH 抗体の感染防御効果の評価

縦軸はマウスの生存率、横軸は感染後の日数を表す。VHH 抗体の投与量が多いほど、マウスの生存率が高いという結果であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Harada Yuichi, Takahashi Hitoshi, Trusheim Heidi, Roth Bernhard, Mizuta Katsumi, Hirata Saito Asumi, Ogane Teruko, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Yamamoto Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Influenza and Other Respiratory Viruses	6. 最初と最後の頁 204 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/irv.12694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura Kazuya, Harada Yuichi, Takahashi Hitoshi, Trusheim Heidi, Bernhard Roth, Hamamoto Itsuki, Hirata-Saito Asumi, Ogane Teruko, Mizuta Katsumi, Konomi Nami, Konomi Yasushi, Asanuma Hideki, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Yamamoto Norio	4. 巻 37
2. 論文標題 Systematic evaluation of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for preparing influenza vaccine seed virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6526 ~ 6534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.08.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tateishi Koichiro, Fujihashi Kohtarō, Yamamoto Norio, Hasegawa Hideki, Ainai Akira, Sato Kayoko, Iho Sumiko, Yamamoto Saburo, Maeyama Jun-ichi, Odagiri Takato, Asanuma Hideki	4. 巻 37
2. 論文標題 CpG ODN G9.1 as a novel nasal ODN adjuvant elicits complete protection from influenza virus infection without causing inflammatory immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5382 ~ 5389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.07.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji R, Yamamoto N, Yamada S, Fujii T, Yamamoto N, Kanauchi O.	4. 巻 160
2. 論文標題 Induction of anti-viral genes mediated by humoral factors upon stimulation with Lactococcus lactis strain plasma results in repression of dengue virus replication in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2018.10.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki H, Tsuji R, Sugamata M, Yamamoto N, Yamamoto N, Kanauchi O	4. 巻 43
2. 論文標題 Administration of plasmacytoid dendritic cell-stimulative lactic acid bacteria is effective against dengue virus infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Med	6. 最初と最後の頁 426-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2018.3955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo M, Yamamoto N, Hishinuma T, Hiramatsu K	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification of a novel gene associated with high-level $\beta$ -lactam resistance in heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain Mu3 and methicillin-resistant S. aureus strain N315.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00712-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hishinuma T, Tada T, Kuwahara-Arai K, Yamamoto N, Shimojima M, Kirikae T	4. 巻 13
2. 論文標題 Spread of GES-5 carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0207134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo M, Hiramatsu M, Singh M, Sasaki T, Hishinuma T, Yamamoto N, Morimoto Y, Kirikae T, Hiramatsu K	4. 巻 63
2. 論文標題 Genetic and transcriptomic analyses of ciprofloxacin-tolerant Staphylococcus aureus isolated by the Replica Plating Tolerance Isolation System (REPTIS)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02019-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii T, Jounai K, Horie A, Takahashi H, Suzuki H, Ohshio K, Fujiwara D, Yamamoto N	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of heat-killed <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 513-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Yamato, Nithichanon Arnone, Nobusawa Eri, Moise Leonard, Martin William D., Yamamoto Norio, Terahara Kazutaka, Hagiwara Haruhisa, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Lertmemongkolchai Ganjana, Takeyama Haruko, De Groot Anne S., Ato Manabu, Takahashi Yoshimasa	4. 巻 7
2. 論文標題 A humanized mouse model identifies key amino acids for low immunogenicity of H7N9 vaccines	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-01372-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T	4. 巻 55
2. 論文標題 Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2646-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.5b01087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 御子神拓樹、臼井麻琴、阿部史弥、渡辺マコ、築地 信、山本典生、東 伸昭
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染における細胞表層ヘパラン硫酸の関与
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Tateishi, Kayoko Sato, Eita Sasaki, Takuo Mizukami, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Norio Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Hideki Asanuma
2. 発表標題 Evaluation of effectiveness and safety of CpG-ODN G9.1 as mucosal adjuvant for nasal influenza vaccines
3. 学会等名 第12回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 敏雄、山本 典生
2. 発表標題 Lactococcus lactis JCM 5805含有食品摂取が免疫因子およびウイルス反応性に与える影響
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会・第66回日本化学療法学会総会 合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 護友、平松 啓一、切替 照雄、山本 典生
2. 発表標題 Cyclosporin A誘導体によるインフルエンザウイルス増殖抑制効果の解析
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会・第66回日本化学療法学会総会 合同学会、岡山コンベンションセンター
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichiro Tateishi, Kayoko Sato, Eita Sasaki, Takuo Mizukami, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Norio Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Hideki Asanuma
2. 発表標題 Assessment of G9.1-induced innate immune responses for the development of safe nasal influenza vaccines
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本典生
2. 発表標題 ウイルス感染防御と乳酸菌 - ヒトに対する効果
3. 学会等名 日本感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideki Asanuma, Koichiro Tateishi, Kayoko Sato, Hideki Hasegawa, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Norio Yamamoto
2. 発表標題 Essential roles for protective SIgA Abs induced by nasal G9.1 combined influenza VLP vaccine
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 立石恒一郎、山本典生、佐藤佳代子、長谷川秀樹、前山順一、伊保澄子、山本三郎、小田切孝人、藤橋浩太郎、浅沼秀樹
2. 発表標題 2つの感染モデルを用いたCpG-ODN G9.1添加経鼻インフルエンザワクチンの有効性
3. 学会等名 日本ワクチン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻 亮平, 藤井敏雄, 金内 理, 山本典生
2. 発表標題 Lactococcus lactis JCM 5805 刺激によって産生される液性因子によるデングウイルス増殖抑制効果
3. 学会等名 日本感染症学会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Hideki Asanuma, Koichiro Tateishi, Hideki Hasegawa, Norio Yamamoto, Kayoko Sato, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Takato Odagiri, Kohtaro Fujihashi
2. 発表標題 Enhancement of protective mucosal immunity against influenza virus infection by a combination of Influenza antigen plus G9.1 (CpG ODN) as nasal adjuvant
3. 学会等名 International congress of mucosal immunology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本典生, 立石恒一朗, 長谷川秀樹, 前山順一, 伊保澄子, 山本三郎, 藤橋浩太郎, 浅沼秀樹
2. 発表標題 CpG-ODN G9.1併用経鼻インフルエンザVLPワクチンの有効性に関する検討
3. 学会等名 日本ワクチン学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 浅沼秀樹, 立石恒一朗, 山本典生, 佐藤佳代子, 長谷川秀樹, 前山順一, 伊保澄子, 山本三郎, 藤橋浩太郎, 小田切孝人
2. 発表標題 新規粘膜アジュバントとしてのCpG-ODN G9.1の経鼻インフルエンザワクチンへの応用
3. 学会等名 日本ワクチン学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hideki Asanuma, Koichiro Tateishi, Hideki Hasegawa, Junichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Norio Yamamoto
2. 発表標題 Effectiveness of A Novel Nasal Influenza Vaccine Consist of HA VLP and CpG-ODN G9.1
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浅沼 秀樹  (Asanuma Hideki)		
研究協力者	村上 明一  (Murakami Akikazu)		
研究協力者	内藤 俊夫  (Naito Toshio)		