

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07141

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスNA蛋白質の抗原性変化におけるADCC依存性防御抗体の役割

研究課題名(英文) Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus.

研究代表者

山吉 誠也 (Yamayoshi, Seiya)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50529534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス感染患者から得たNA蛋白質のHead領域の側面を認識するモノクローナル抗体は、ウイルスのシアリダーゼ活性を阻害しなかった。そのため、培養細胞でのウイルス増殖を抑制することはできなかった。しかし、マウスでの感染実験では、本抗体がFc受容体を介した免疫細胞の活性化により感染防御活性を有することが明らかになった。また、インフルエンザウイルス感染者の血清を用いた解析から、NA蛋白質の側面領域に対する抗体が感染により誘導されること、およびNA蛋白質側面の抗原性が変化していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NA蛋白質の側面領域を認識し、ウイルスのシアリダーゼ活性を阻害しない抗体も免疫細胞を活性化することで生体におけるウイルス増殖を抑制し、感染防御に寄与することが明らかになった。また、NA蛋白質側面のアミノ酸変異の蓄積が感染防御活性を持つ抗体の選択圧により引き起こされていることを示した。これにより、今後のワクチン株の選定の際、HA蛋白質の抗原性のみでなく、NA蛋白質の抗原性についても考慮することで、より効果の高いワクチン株の選定に資すると考える。

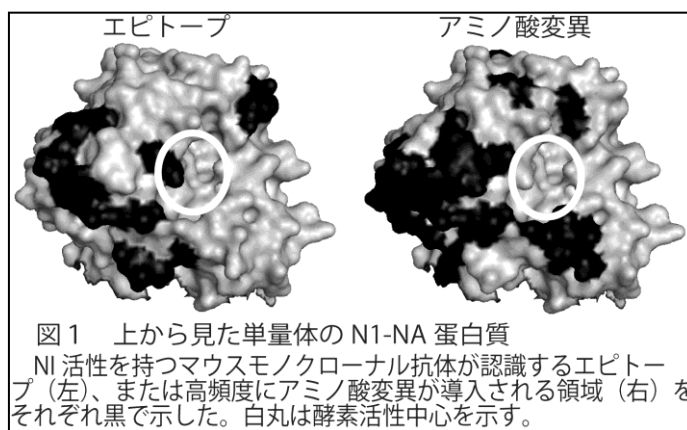
研究成果の概要(英文)：The reason for accumulation of amino acid substitutions at the lateral surface of the NA head remains unknown. Here, we isolated anti-NA monoclonal antibodies (mAbs) from individuals infected with A(H1N1)pdm09 virus. We found that amino acid mutations on the lateral surface of the NA head abolished the binding of these mAbs. These mAbs activated Fc receptor (FcR)-mediated signaling pathways in effector cells and protected mice from lethal challenge infection via their FcR-mediated antiviral activity. Serological analysis of individuals who were infected with A(H1N1)pdm09 virus revealed that some possessed or acquired the anti-NA lateral surface antibodies upon infection. We also found antigenic drift on the lateral surface of the NA head between 2009 isolates and 2015 isolates.

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 NA蛋白質 抗原性 ヒトモノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスの粒子上には、2つの糖蛋白質(HA蛋白質とNA蛋白質)が存在する。NA蛋白質に対する抗体は、インフルエンザウイルスの感染やワクチン接種により誘導され、ウイルスの増殖を抑制する(Monto et al. 2015 J Infect Dis)。感染防御活性をもつ抗体から逃れるため、NA蛋白質においても抗原部位に変異が導入され抗原性が変化する(Luther et al. 1984 J Hyg)。感染防御に働く抗体として、NA蛋白質のノイラミニダーゼ活性を阻害する(NI)活性を持つ抗体が注目され、マウスモノクローナル抗体を用いた研究が精力的に行われた。その結果、NI活性を持つマウス抗体は、酵素活性部位の周辺を認識することが明らかとなった(Colman et al. 1983 Nature; 図1左)。また、過去の流行株のNA蛋白質のアミノ酸配列を比較すると、NI活性を持つ抗体のエピトープやその周辺には多くのアミノ酸変異が認められた(Fanning et al. 2000 Virology; 図1右)。現在、NA蛋白質の抗原性変化は、主にNI活性を持つ抗体により引き起こされると考えられている。一方で、NI活性を持つ抗体のエピトープやNA阻害薬への感受性に関わる部位以外の“NA分子の側面”にも高頻度に変異が生じている。これらの領域に、高頻度でアミノ酸変異が生じる理由は不明であった。



我々は、2015-2016 インフルエンザシーズンにA型インフルエンザウイルス(H1N1pdm09)に感染した患者からNA蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体7クローンをハイブリドーマ法により樹立した。これらの抗体はNI活性を示さず、培養細胞でのウイルス増殖阻害活性も持たないが、マウスでは致死量のウイルスによる感染を防御した(表1)。この結果は、樹立したヒト抗NA抗体が、生体内においてのみ機能する機構により、ウイルスの増殖を抑制することを示している。また、これらの抗体が、NA蛋白質の既知のエピトープ領域(図1左)ではなく、NA分子側面にある高頻度に変異が導入される領域を認識することを明らかにしていた。

表1 抗NAモノクローナル抗体の性状の比較

	培養細胞での 増殖阻害活性	マウスでの 感染防御活性
樹立したヒト抗NA抗体	×	○
NI活性を持つマウス抗体	○	○

2. 研究の目的

既に樹立したNA蛋白質のノイラミニダーゼ活性を阻害しない抗NA抗体が、感染防御を示すメカニズムを明らかにすることを目的とする。それと共に、この種の抗体がNA蛋白質の抗原性変化に寄与することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ADCC活性依存的な感染防御能の検討

申請者が樹立したウイルスのシアリダーゼ活性を阻害しない(NI活性を持たない)抗NA抗体の感染防御活性の作用機序は、抗体依存的細胞障害(ADCC)であるという仮説を立て、それを証明するために以下の①および②の実験を行う。

① ADCC 活性を誘導しない変異型ヒト抗 NA 抗体を用いたマウス感染防御実験

抗体の Fc 領域に N297Q 変異を導入した変異型ヒト抗体は、マウス体内において ADCC 活性を誘導しない(Overdijk et al. 2012 J Immunol)。そこで、N297Q 変異を導入した変異型ヒト抗 NA モノクローナル抗体を用いた感染防御試験を行う。様々な量の野生型または変異型ヒト抗 NA モノクローナル抗体を前日に腹腔内投与したマウス (BALB/c) に、H1N1pdm09 ウイルスを 50%マウス致死量の 10 倍量、経鼻的に接種する。接種後 2 週間、マウスの体重変化を観察し、感染防御するかを検討する。

② ヒト抗 NA 抗体によるヒト Fc ガンマレセプター (Fc γ R) を介したシグナル誘導実験

ADCC 活性を定量的かつ再現性良く測定するために、ヒトの Fc γ R および NFAT-誘導性ルシフェラーゼを安定発現させた Jurkat 細胞(Promega 社より購入可能)をエフェクター細胞として用いる。NA 蛋白質発現細胞やウイルス感染細胞をターゲット細胞とし、野生型および変異型のヒト抗 NA 抗体を介したシグナルの活性化をルシフェラーゼアッセイにより定量する。

(2) NI 活性を持たない抗 NA 抗体による NA 蛋白質の抗原性変化

樹立したヒト抗 NA 抗体が認識する領域には、頻りにアミノ酸変異が生じることが疫学調査により明らかにされている(Fanning et al. 2000 Virology)。この事実を実験的に補うために、以下の実験を行う。

① ヒト血清を用いた NA 蛋白質の抗原性解析

樹立したヒト抗 NA 抗体のエピトープに導入されたアミノ酸変異が、NA 蛋白質の抗原性に及ぼす影響を検討するため、野生型および変異型精製 NA 蛋白質の抗原性が変化しているかを 2009 年以降に採取されたヒト血清を用いた ELISA を行う。

4. 研究成果

まず、モノクローナル抗体の Fc 領域に N297Q 変異を導入し、ADCC 活性を誘導出来ない変異抗体を作製した。この変異型抗体と野生型抗体を用いて感染防御試験を行ったところ、変異型抗体では感染防御活性が見られなかった 5 クローン (DA05C23、HP02B69、HP02E74、HP02E63、HP02B24) は ADCC 活性が感染防御の中心的役割を担っており、感染防御活性が維持される 2 クローン (HP02C70 および DA05B02) は NI 活性が感染防御の中心的役割を担っていると考えられる (図 2)。

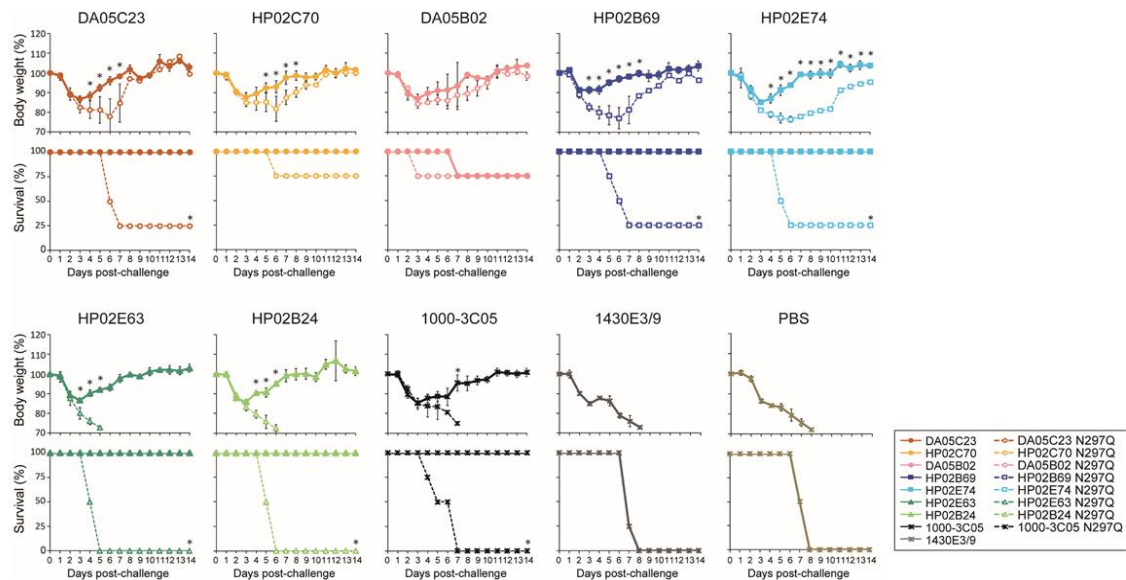


図 2 NA蛋白質の側面を認識する抗体はADCC活性依存性感染防御を示した

次に、7 種類の抗体が Fc γ 受容体を介して免疫細胞を活性化することができるのかを NA 蛋白質を発現させたヒト細胞 (図 3 上) およびウイルス感染させたヒト細胞 (図 3 下) を標的細胞として、ADCC レポーターアッセイを行った。標的細胞として、感染細胞または NA 蛋白質発現細胞のどちらを用いた場合であっても、抗体の Fc 領域に N294Q 変異を導入した変異型抗体ではレポーター蛋白質の発現は確認されなかったが、野生型抗体では Fc γ 受容体を介したシグナルの活性化が起き、レポーター蛋白質の発現が上昇していた。特に HP02C70 および DA05B02 では、高い ADCC 活性が認められた。

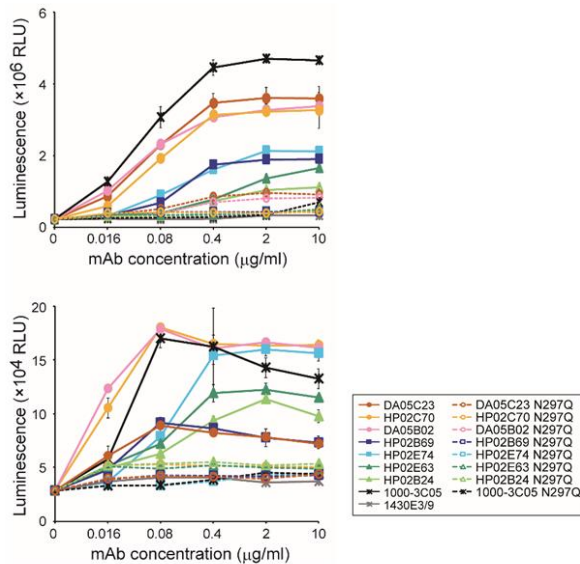


図3 NA蛋白質の側面を認識するモノクローナル抗体によるADCC活性の測定

最期に、NA 蛋白質の抗原性変化がどの領域に起きたアミノ酸変異に起因しているのかを検討することにした。まず、2009年に流行していたウイルスのNA蛋白質と2015年に流行していたウイルスのNA蛋白質の配列を比較し、異なるアミノ酸を同定した。同定したアミノ酸変異をその領域ごと〔図4（左）シアリダーゼ活性部位周辺、図4（中）NA蛋白質の側面、図4（右）NA蛋白質のStalk領域〕に分けて、2009年のNA蛋白質に導入したそれぞれ変異体NA蛋白質を準備した。それらと2009年のNA蛋白質に対するヒト血清の抗体価をELISAにて測定したところ、シアリダーゼ活性部位周辺にアミノ酸変異を導入した場合、大きく抗体価が低下した検体が多くみられた。一方、NA蛋白質のStalk領域にアミノ酸変異を導入した場合、ほとんど抗体価は変わらなかったが、NA蛋白質の側面にアミノ酸変異を導入した場合には、一部の検体で大きく抗体価が低下していた。

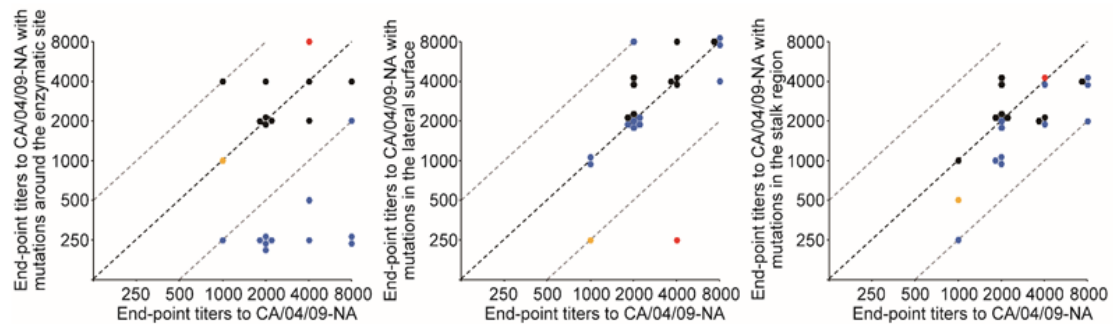


図4 NA蛋白質の側面を認識する抗体量の測定

以上の結果から、NA蛋白質の側面領域を認識し、NI活性を持たない抗体も免疫細胞を活性化することで生体での感染を防御することがわかった。また、NA蛋白質側面のアミノ酸変異の蓄積も感染防御活性を持つ抗体の選択圧により引き起こされていることが示唆された。

インフルエンザウイルスのNA蛋白質に対する抗体やそれらのADCC活性にも注目が集まっている。本研究ではADCC活性依存的な感染防御能のみならず、それと流行株の抗原性変化と結び付けた解析を行い、NA蛋白質の抗原性変化におけるADCC依存性防御抗体の役割を明らかにした。それにより、今後のワクチン株の選定の際、HA蛋白質の抗原性のみでなく、NA蛋白質の抗原性についても考慮することで、より効果の高いワクチン株を選定することが出来ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yasuhara Atsuhiko, Yamayoshi Seiya, Kiso Maki, Sakai-Tagawa Yuko, Koga Michiko, Adachi Eisuke, Kikuchi Tadashi, Wang I-Hsuan, Yamada Shinya, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 1024 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-019-0401-1	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 Kawakami Chiharu, Yamayoshi Seiya, Akimoto Miki, Nakamura Kazuya, Miura Hideka, Fujisaki Seichiro, Pattinson David J., Shimizu Kohei, Ozawa Hiroki, Momoki Tomoko, Saikusa Miwako, Yasuhara Atsuhiko, Usuku Shuzo, Okubo Ichiro, Toyozawa Takahiro, Sugita Shigeo, Smith Derek J., Watanabe Shinji, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eurosurveillance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.6.1800467	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 Ito Mutsumi, Yamayoshi Seiya, Murakami Kazushi, Saito Kenji, Motojima Atsuo, Nakaishi Kazunari, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of Mouse Monoclonal Antibodies Against the HA of A(H7N9) Influenza Virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 149 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11020149	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 Okuda Moe, Yamayoshi Seiya, Uraki Ryuta, Ito Mutsumi, Hamabata Taiki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Subclade 2.2.1-Specific Human Monoclonal Antibodies That Recognize an Epitope in Antigenic Site A of Influenza A(H5) Virus HA Detected between 2015 and 2018	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 321 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11040321	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 Yamayoshi Seiya, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Current and future influenza vaccines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 212 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-018-0340-z	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 Tabata Kazuhito V., Minagawa Yoshihiro, Kawaguchi Yuko, Ono Mana, Moriizumi Yoshiki, Yamayoshi Seiya, Fujioka Yoichiro, Ohba Yusuke, Kawaoka Yoshihiro, Noji Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Antibody-free digital influenza virus counting based on neuraminidase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37994-6	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 Yasuhara Atsuhiko, Yamayoshi Seiya, Ito Mutsumi, Kiso Maki, Yamada Shinya, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Human Monoclonal Antibodies That Recognize the Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Hemagglutinin Receptor-Binding Site and Rarely Yield Escape Mutant Viruses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.02660	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 Matsuzawa, Iwatsuki-Horimoto, Nishimoto, Abe, Fukuyama, Hamabata, Okuda, Go, Watanabe, Imai, Arai, Fouchier, Yamayoshi, Kawaoka	4. 巻 11
2. 論文標題 Antigenic Change in Human Influenza A(H2N2) Viruses Detected by Using Human Plasma from Aged and Younger Adult Individuals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 978 ~ 978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v111110978	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 Kiso Maki, Yamayoshi Seiya, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Triple combination therapy of favipiravir plus two monoclonal antibodies eradicates influenza virus from nude mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0952-y	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 安原敦洋、山吉誠也	4. 巻 22
2. 論文標題 A(H1N1)pdm09ウイルスのHA蛋白質とNA蛋白質の抗原性変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 インフルエンザ [その他の呼吸器感染症]	6. 最初と最後の頁 31-37
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 無
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 山吉誠也、安原敦洋	4. 巻 62
2. 論文標題 インフルエンザウイルスのNA蛋白質に対する抗体と感染防御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 145-152
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 無
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7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山吉誠也
2. 発表標題 インフルエンザウイルスからあなたを守る抗体の話
3. 学会等名 第14回ラブラボ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山吉誠也
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのHAおよびNA蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体の性状解析
3. 学会等名 第33回インフルエンザ交流の会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamayoshi S, Yasuhara A, Kiso M, Kawaoka Y
2. 発表標題 Human monoclonal antibodies that recognize the HA of both influenza B lineages
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuhiko Yasuhara, Seiya Yamayoshi, Maki Kiso, Yuko Sakai-Tagawa, Michiko Koga, Eisuke Adachi, Tadashi Kikuchi, I-Hsuan Wang, Shinya Yamada, and Yoshihiro Kawaoka
2. 発表標題 Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus.
3. 学会等名 OPTIONS X for the Control of Influenza (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhara A, Yamayoshi S, Kiso M, Yamada S, Kawaoka Y
2. 発表標題 The potential of human monoclonal antibodies that recognize the influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinin receptor-binding site as anti-influenza agents.
3. 学会等名 17th Negative Strand Virus Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamayoshi S, Kawaoka Y
2. 発表標題 Human monoclonal antibodies against influenza virus
3. 学会等名 MEDLAB Asia Pacific & Asia Health Exhibition & Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yamayoshi, A. Yasuhara, M. Ito, R. Uraki, Y. Kawaoka
2. 発表標題 Differences in the ease with which mutant viruses escape from human monoclonal antibodies against the HA stem of influenza A virus
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関