

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07038

研究課題名（和文）全ての亜型のA型インフルエンザウイルスのHA蛋白質に保存される新規抗原部位の同定

研究課題名（英文）Identification of a novel epitope conserved among influenza A viruses

研究代表者

山吉 誠也（Yamayoshi, Seiya）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・部長

研究者番号：50529534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：A型インフルエンザウイルスの全ての亜型のHA蛋白質を認識するヒトモノクローナル抗体4F02に関して、各種感染阻害活性を測定するとともに、エピトープの解析を行いました。4F02は、H3N2ウイルスに対して中和活性、赤血球凝集阻害活性、HA蛋白質の膜融合活性をそれぞれ阻害するのみでなく、Fc受容体を介した免疫細胞の活性化を引き起こしました。また、4F02は、H1N1pdm09、H3N2、H5N1およびH7N9ウイルスによる致死的な感染に対して防御効果を示しました。エスケープ変異ウイルスの解析やクライオ電子顕微鏡解析により、4F02がHA蛋白質のヘッド基部を認識していることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての亜型のA型インフルエンザウイルスのHA蛋白質を認識するヒトモノクローナル抗体である4F02のエピトープを同定したことにより、HA蛋白質に存在する亜型間で高度に保存されたエピトープを明らかにすることが出来ました。このような保存性の高いエピトープに対する抗体を効率的に誘導するワクチンをデザインすることが出来れば、一つの亜型のインフルエンザウイルスのみならず、様々な亜型のインフルエンザウイルスに対して有効なユニバーサルインフルエンザワクチンとなる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：To enhance our understanding of the epitopes recognized by heterosubtypic mAbs, we attempted to identify cross-reactive human mAbs from a panel of mAbs that were previously reported to be specific for H3-HA. We clarified the cross-reactivity of seventy-five mAbs by ELISA and found that clone 4F02 was broadly reactive against all 18 HA subtypes of influenza A viruses. 4F02 neutralized several H3N2 viruses in vitro, showed weak hemagglutination inhibitory activity, inhibited HA-mediated fusion activity, activated the Fc receptor-mediated signaling pathway in effector cells, and protected mice against lethal challenge infection with H1N1pdm09, H3N2, H5N1, and H7N9 viruses. Cryo-EM analysis revealed that 4F02 targeted the base of the HA head. Its epitope consisted of amino acid residues within the antigenic sites C, D, and E, spanning between the HA head and stem. This finding provides novel insight into the development of a universal influenza vaccine.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ HA蛋白質 モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトでは H1N1pdm09 亜型および H3N2 亜型の A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスが季節性の流行を続けている。現行のインフルエンザワクチンは、これら季節性インフルエンザウイルスの HA 蛋白質に対する抗体を誘導することを目的とする。HA 蛋白質は構造上、Head 領域と Stem 領域に分けられる (図 1)。現行のワクチンによって誘導される抗体のほとんどは、抗原性の高い Head 領域の受容体結合部位 (図 1、点線で囲われた部位) 周辺を認識する (Wong et al. Clin Microbiol Rev. 2013)。しかし、Head 領域の受容体結合部位周辺のアミノ酸は容易に変異し、その抗原性は変化しやすい。そのため、抗原性の変化した HA 蛋白質を持つウイルスが出現・流行した場合、ワクチンにより誘導された抗体が結合できないため、ワクチンの有効性は著しく低下してしまう (Heaton et al. PNAS. 2013)。これを解決するために、HA 蛋白質の中でも抗原性が変化しにくい領域、つまりアミノ酸配列が高度に保存された領域を抗原として用いるワクチンの研究が世界的に行われている。このようなワクチンは、受容体結合部位周辺で起きるアミノ酸変異による抗原性変化の影響を受けにくい次世代型ワクチンとして注目されている (Yamayoshi et al. Nat Med. 2019)。

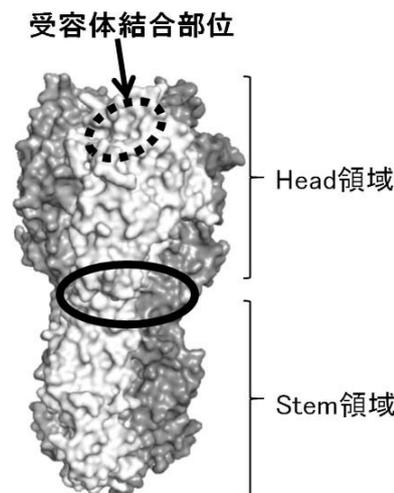


図1 HA蛋白質の立体構造
黒線で囲われた部分がHead領域とStem領域の境界部

HA 蛋白質の中で、アミノ酸配列が高度に保存され、抗原性が変化しにくい領域を探索するプローブとして、ヒトモノクローナル抗体が利用されてきた。つまり、A 型インフルエンザウイルスに感染、もしくはインフルエンザワクチンを接種したヒトから得られたヒトモノクローナル抗体の中に、様々な亜型の HA 蛋白質を認識する抗体が見出され、それらは HA 蛋白質の Head 領域の受容体結合部位 (図 1、点線で囲われた部分)、もしくは Stem 領域を認識していた (Crowe et al. Cell Host Microbe. 2017)。現在、HA 蛋白質のアミノ酸配列が高度に保存され、抗原性が変化しにくい領域は“受容体結合部位”および“Stem 領域”のみだと考えられているが、それ以外にも未だ報告のない抗原性が保存された領域が存在するのではないかと考えた。

これまでに、H3 亜型の HA 蛋白質への結合を指標に得た 76 種類のヒトモノクローナル抗体から、全ての亜型の HA 蛋白質に結合するヒトモノクローナル抗体 (クローン 4F2) を見出した。クローン 4F2 は、培養細胞におけるウイルスの増殖を阻害する活性を示した。4F2 が認識するエピトープを推定するために、クローン 4F2 からのエスケープ変異の同定を試みたところ、HA 蛋白質の Head 領域と Stem 領域の境界部 (図 1、黒線で囲われた部分) に、エスケープ変異が同定された。以上の結果から、クローン 4F2 が全ての亜型の HA 蛋白質に保存される新規領域を認識する中和抗体であることが推測されていた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトモノクローナル抗体クローン 4F2 が、HA 蛋白質の Head 領域と Stem 領域の境界部を認識し、感染防御活性を持つことを示し、この領域が新たな“抗原性保存領域”であることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

① Head 領域または Stem 領域を認識する抗体との競合結合試験

Head 領域と Stem 領域の境界領域を認識するクローン 4F2 は、HA 蛋白質への結合に関し、Head 領域または Stem 領域を認識する抗体と競合しないと考えられる。そこで、バイオセンサーを用いた生体分子間相互作用解析システム「Octet」を用いて、競合結合試験を行った。バイオセンサーに精製 HA 蛋白質を結合させ、Head 領域を認識する抗体または Stem 領域を認識する抗体を結合させた。その後、クローン 4F2 を反応させ、Head 領域または Stem 領域に対する抗体と競合するかを観察した。

② クローン 4F2 と精製 HA 蛋白質を用いた電子顕微鏡解析

クローン 4F2 の結合領域や結合様式を直接観察するため、クローン 4F2 の Fab および三量体 HA 蛋白質を混和し、両者を結合させた。三量体 HA 蛋白質と Fab が結合した複合体をゲルろ過カラムにより精製し、電子顕微鏡を用いて複合体を撮影した。1 万個以上の複合体の画像を用いて複合体の 2 次元分類および 3 次元構造の再構成を行った。

③ マウス感染モデルでの感染防御試験

クローン 4F2 の感染防御試験は、ヒトへの感染が問題となっている H1N1pdm09 亜型、H3N2 亜型、H5N1 亜型および H7N9 亜型のウイルスを用いて行った。感染 1 日前にクローン 4F2 または陰性コントロール抗体をマウス (BALB/c、1 群 4 匹) に腹腔内投与した。その後、50%マウス致死量の 10 倍のウイルスを経鼻的に接種し、マウスの体重変化を 2 週間観察することで、致死感染からマウスを防御するかを検討した。

④ 抗体のウイルス増殖阻害メカニズムの解析

インフルエンザウイルスの HA 蛋白質に対する抗体の生体での増殖阻害メカニズムは、主に (A) HA 蛋白質の受容体結合能の阻害、(B) HA 蛋白質の膜融合活性の阻害および (C) 抗体の Fc 領域を介した免疫細胞活性化である。これらの増殖阻害への貢献度は、抗体の認識部位により異なる。Head 領域を認識する抗体は主に (A) により、Stem 領域を認識する抗体は主に (B) および (C) によりウイルスの増殖を阻害する。そこで、Head 領域と Stem 領域の境界部を認識するクローン 4F2 がどのようなメカニズムでウイルス増殖を抑制するのかを (A) 赤血球凝集抑制試験、(B) 多核巨細胞形成抑制試験、(C) ADCC レポーターアッセイによりそれぞれの阻害活性を評価した。

⑤ 新規抗原性保存領域に対する抗体の保有率

クローン 4F2 からのエスケープ変異を持った HA 蛋白質と野生型の HA 蛋白質に対するヒト血清の反応性を比較した。これにより、この領域に対する抗体保有率を検証した。

4. 研究成果

4F2 のエピトープ解析をバイオセンサーを用いた生体分子間相互作用解析システム「Octet」を用いて行ったところ、本抗体は Stem 領域を認識するモノクローナル抗体 (図 2 左) および Head 領域を認識するモノクローナル抗体 (図 2 右) と H3-HA 蛋白質への結合について競合は認められなかった。よって、4F2 は既存の交叉反応性抗体が認識する領域とは異なる部位を認識することが確認された。

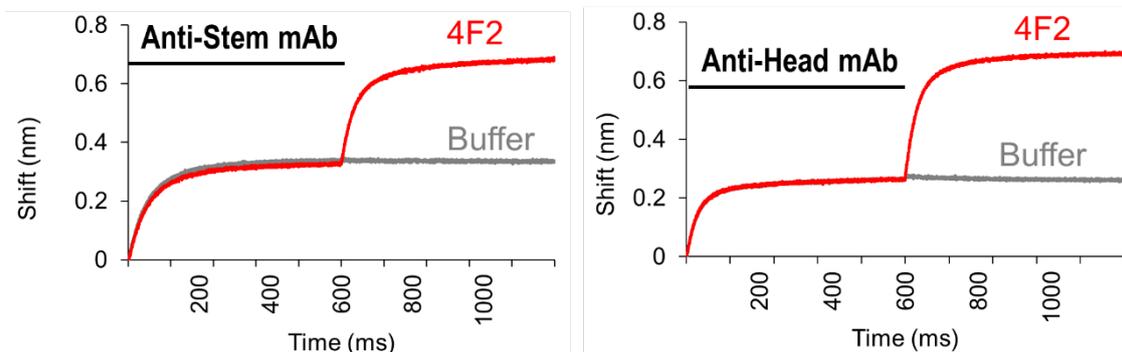


図 2 抗 Stem 抗体(左)または抗 Head 抗体(右)と 4F2 の HA 蛋白質に対する結合

次に、本抗体が認識するエピトープを明らかにするために、クライオ電子顕微鏡解析を実施した。Fab 型抗体と三量体組換え HA 蛋白質を 1 : 2 対 1 の割合で混合し、HA 蛋白質/Fab 複合体を形成したフラクシヨンのみをゲルろ過により精製した。精製した複合体をクライオ電子顕微鏡で撮影し、計 260 万個の複合体像を得た。得られた画像を元に 3 次元構造を構築した (図 3)。構築した立体構造は、抗体のエピトープ解析には十分と考えられる 2.44 オングストロームの解像度を示した。構造解析により、本抗体 (緑/シアン色) が、HA 蛋白質のヘッド領域とステム領域の境界部分を認識していることが明らかとなった。

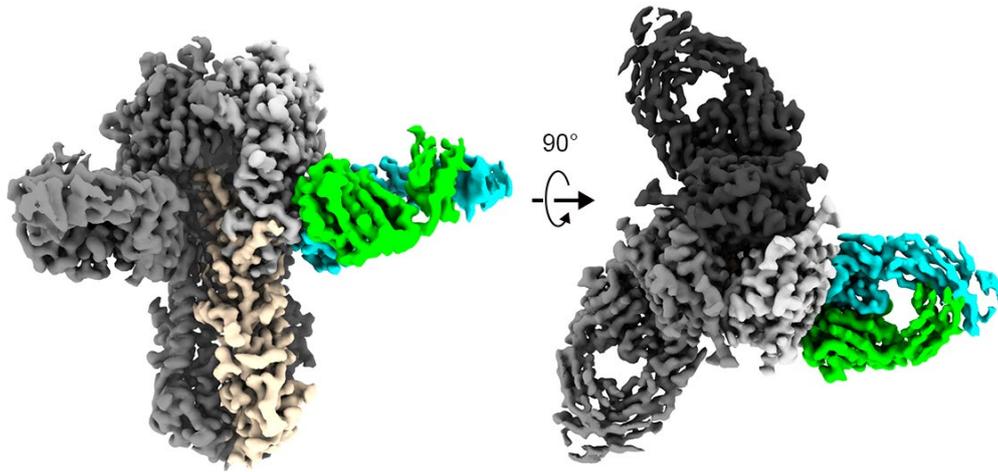


図3 4F2 (緑/シアン) の HA 蛋白質に対する結合様式

次に、マウスにおける感染防御試験を行った。あらかじめ 4F2 抗体を投与したマウスに H1N1pdm09 亜型、H3N2 亜型、H5N1 亜型および H7N9 亜型の A 型インフルエンザウイルスをそれぞれ致死量感染させ、その後の体重変化を観察した。その結果、コントロール抗体を投与したマウスは全て死亡したのに対し、本抗体を投与したマウスは全て生き残った (図4)。よって、本抗体には感染防御能があることが示された。

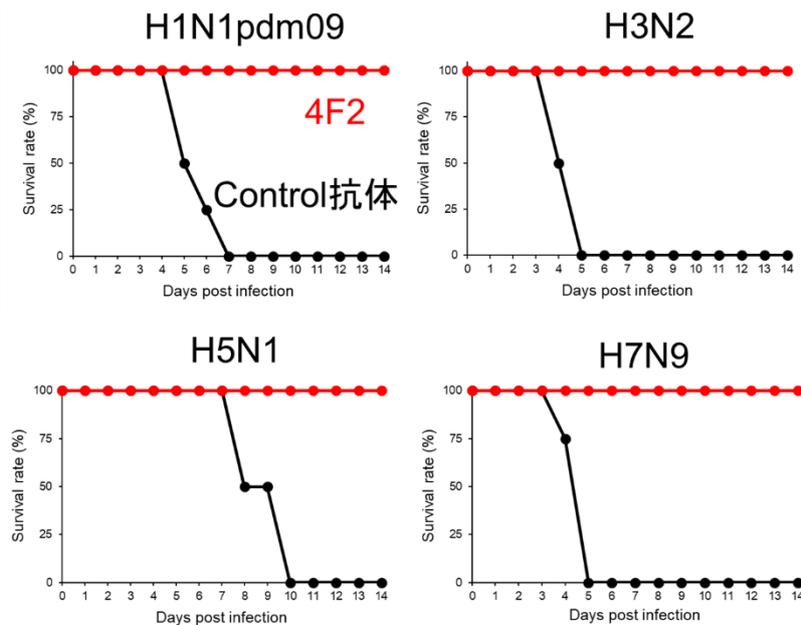


図4 マウス感染モデルにおける感染防御試験

本抗体の感染阻害メカニズムを明らかにするため、赤血球凝集抑制 (HI) 試験、ポリカリオン (シンシチウム) 形成抑制試験および ADCC レポーターアッセイ評価を行った。本抗体は、赤血球凝集抑制 (HI) 活性を示し (図5A)、細胞融合によるシンシチウム形成を抑制し (図5B)、さらに ADCC 活性を示した (図5C)。よって、本抗体は、これら3つの活性が複合的に寄与することで、ウイルスの増殖を抑制している可能性が示された。

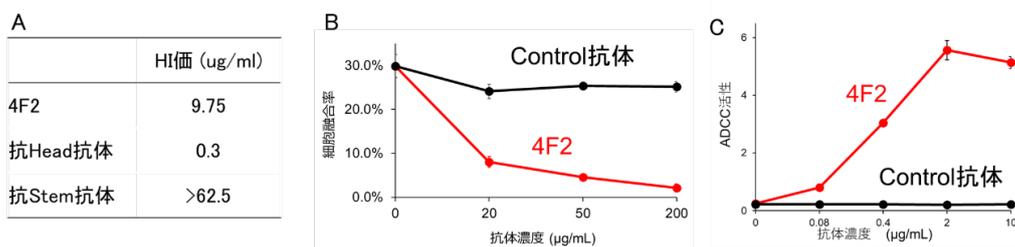


図5 本抗体による感染阻害メカニズムの解析

最後に、本抗体が認識するエピトープと同じ領域に対する抗体を持つ人がどれくらいいるのかを、エスケープ変異を導入した組換え HA 蛋白質と野生型 HA 蛋白質に対する反応性を比較することで調査した。その結果、この領域を認識する抗体を持つ人は一定数いる者の、それほど多くないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuda Moe, Sakai-Tagawa Yuko, Koga Michiko, Koibuchi Tomohiko, Kikuchi Tadashi, Adachi Eisuke, Ahyoung Lim Lay, Yamamoto Shinya, Yotsuyanagi Hiroshi, Negishi Kyota, Jubishi Daisuke, Yamayoshi Seiya, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 226
2. 論文標題 Immunological Correlates of Prevention of the Onset of Seasonal H3N2 Influenza	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1800 ~ 1808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiac152	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 Yasuhara Atsuhiko, Yamayoshi Seiya, Kiso Maki, Sakai-Tagawa Yuko, Okuda Moe, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 A broadly protective human monoclonal antibody targeting the sialidase activity of influenza A and B virus neuraminidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-022-34521-0	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 Soga T, Duong C, Pattinson D, Sakai-Tagawa Y, Tokita A, Izumida N, Nishino T, Hagiwara H, Wada N, Miyamoto Y, Kuroki H, Hayashi Y, Seki M, Kasuya N, Koga M, Adachi E, Iwatsuki-Horimoto K, Yotsuyanagi H, Yamayoshi S, Kawaoka Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Isolated in the 2018?2019 and 2019?2020 Influenza Seasons in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 535 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v15020535	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 該当する

1. 著者名 Fukuyama Satoshi, Shoemaker Jason E., Zhao Dongming, Nagajima Noriko, Tomita Yuriko, Maemura Tadashi, da Silva Lopes Tiago Jose, Watanabe Tokiko, Yamayoshi Seiya, Hasegawa Hideki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Attenuation of A(H7N9) influenza virus infection in mice exposed to cigarette smoke	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 npj Viruses	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/s44298-024-00026-4	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Okuda M, Sakai-Tagawa Y, Yamayoshi S, and Kawaoka Y,
2. 発表標題 Immunological correlates of prevention of the onset of seasonal H3N2 influenza
3. 学会等名 CORRELATES OF PROTECTION FOR NEXT GENERATION INFLUENZA VACCINES (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山吉誠也
2. 発表標題 Human monoclonal antibodies against Influenza viruses and antiviral medications approved for COVID-19 treatment
3. 学会等名 World Flu Day 2023 Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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に対する感染防御抗体とSARS-CoV-2に対する抗ウイルス薬
3. 学会等名 馬感染症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------