

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790660

研究課題名（和文）ヒト型抗体を利用したインフルエンザウイルス感染予防に関する研究

研究課題名（英文）Research on protection against influenza viral infection using human monoclonal antibody

研究代表者

安木 真世（YASUGI MAYO）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40589008

研究成果の概要（和文）：

樹立した抗インフルエンザウイルス（Flu）ヒト型抗体 5A7 は B 型 Flu の膜タンパク質 HA の高保存領域を認識し、広域に中和能を示した。マウス感染実験においても治療効果を示したことよりペプチドワクチンの候補になり得ると考えられた。また HA の抗原決定基 Sb を認識する中和抗体 5E4 を用いて 2009 年パンデミック Flu の変異を追跡した。選択圧による Sb 基の抗原変異と遺伝子変異の有意な増加が確認された。GenBank の配列比較から世界的にも Sb 基の変異株が増加しており、次節ワクチン製造には Sb 基の変異を考慮に入れる必要があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our established human monoclonal antibody (HuMAb) 5A7 recognized a highly conserved region of hemagglutinin (HA) in influenza B viruses (FluB). 5A7 broadly neutralized FluB and showed significant therapeutic efficacy in mice. These results indicate that 5A7 provides insight for the development of a universal vaccine against FluB. Also we studied the diversity of A(H1N1)pdm09 using neutralizing HuMAb 5E4 recognizing antigenic site Sb in the HA protein of A(H1N1)pdm09. Neutralization titers were significantly reduced against 5E4 in the 2010/11 compared with the 2009/10 samples. Sequences in Sb were being positively selected between 2009/10 and 2010/11. Variants in the antigenic site Sb increased significantly worldwide from GenBank, indicating that the antigenic variants in Sb are likely to be in global circulation currently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：インフルエンザウイルス、ヒト型抗体

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス（Flu）による国内感染者数は毎年数十万人に達し、乳幼児・老人を中心に約一万人もの犠牲者がでてい。世界全体での犠牲者数は毎年 250,000～500,000 人に達すると報告されている。なぜ予防接種が存在するにも関わらず、感染者数は一向に減少しないのか。その最大の原因は

ウイルスの抗原変異(antigenic drift ならびに antigenic shift)に起因する。Antigenic drift により毎年少しずつウイルス抗原が変化しており、ワクチンにて誘導される抗体が抗原変化に合致しなければワクチンの効果は期待できない。また 2009 年に出現した新型 Flu(A(H1N1)pdm09) に代表される antigenic shift ではウイルス遺伝子分節が

組換えを起こすため、全く異なった抗原を有したウイルスが出現する。その結果、このウイルスに対応したワクチンが開発されるまでの間、予防法は皆無となる。高い致死性を有する高病原性鳥型Fluが直接ヒトに感染し得る現在において強毒ウイルスが世界的流行を引き起こす可能性は十分に考えられる。この問題点を解決するためには広域交差性のワクチンを開発する、または流行株予測をより正確に実施することが必須である。

現在、広域反応性ワクチン開発の材料としてFlu中和モノクローナル抗体が注目されている。従来の研究対象であったマウス中和抗体はヒトとエピトープが同一であるか不明であること、マウスIgGをそのままヒトに応用できないため、ヒト化抗体を作製しなければならないことなどから実用性が疑問視されていた。これら問題点を解決するため、ここ数年ヒト型抗体の研究が飛躍的に増加している。抗体作製にはファージディスプレイ法、EBウイルスを用いた不死化抗体法、そしてヒトフュージョンパートナー細胞を用いた細胞融合法などが挙げられる。申請者所属研究室(大阪大学微生物病研究所)では従来のヒトフュージョンパートナー細胞に比べ細胞融合効率に優れた性質を有したSPYMEG(医学生物学研究所)を用い2008年より抗体治療薬の開発を遂行しており(JICA/JST SATREPS プロジェクト)、申請者も抗Flu中和抗体の作製に従事していた。JICA/JST プロジェクトでは中和抗体を用いた治療薬開発に特化したものであるため、ワクチン開発・抗原変異予測研究等は含まれていなかったが、SPYMEGを用いて得られるヒト型中和抗体は生体内に存在するものをそのまま反映していることから、その認識エピトープを標的としたワクチン開発の実現性が高いことが予想された。

2. 研究の目的

広域ヒト型中和抗体を基にしたワクチン抗原が実用化されれば、今後季節性Fluの抗原変異はもちろんのこと、新たに出現し得る新型Fluへも対応でき得ることが予想される。また狭域中和抗体を利用したエスケープミュータントから得られる次節流行株予測では季節性Fluに適切に対応できるワクチンが製造でき、世界全体で感染者数、特に死者数の大幅な減少が見込まれる。そこでヒト型中和抗体を利用したFluワクチン開発を最終目標とし、本研究においてはヒト型中和抗体の交差反応性を基に、(1)広域交差反応を示す抗体に関してはエピトープ同定を行い、新規ワクチン抗原としての有用性を評価

し、(2)交差反応性が限られている抗体ではエスケープミュータントを基にウイルス抗原変異予測を行い、次節ワクチン抗原に関して有用な情報を提供できるかについて検討した。

3. 研究の方法

(1)Fluワクチン接種者または感染者から採血後末梢血単核球を分離し、ヒトフュージョンパートナー細胞SPYMEGと融合させた。作製したHybridomaのうち抗Fluヒト型中和抗体を選別し、さまざまなウイルス株との交差反応性を評価した。(2)エスケープミュータントの作製または種々の発現プラスミド(truncated form、mutagenesis、キメラ遺伝子)の作製を通しエピトープを同定し高次構造解析にて位置を決定した。(3)マウスへのFlu感染実験を行い、濃度別ならびに投与時期別の中和抗体の治療効果を評価した。(4)A(H1N1)pdm09の遺伝子配列を含めた特性を把握するため、府下の病院ならびに公衆衛生研究所の協力の下、2009/10ならびに2010/11シーズンに臨床検体からウイルス分離を行った。(5)分離ウイルスと抗体との交差反応性を確認し、またアミノ酸配列を決定した。エスケープミュータントを基に予測した抗原変異部位と実際の流行ウイルスの抗原変異部位が合致するか評価し、さらに世界における遺伝子変異状況をGenBankに登録されている配列を基に評価した。

4. 研究成果

Fluワクチン接種者または感染患者の末梢血単核球を用い、10個の広域中和抗体(抗FluA抗体7個、抗FluB抗体3個)と10個の狭域中和抗体(抗A(H1N1)抗体4個、抗A(H3N2)抗体3個、抗A(H1N1)pdm09抗体3個)を含む計47個の抗Fluヒト型抗体産生ハイブリドーマを樹立した。まず抗FluB抗体(5A7、3A2、10C4)を用いて広域中和抗体の研究を行った。3A2と10C4は2系統に分かれるFluBの山形系統のみに強い中和能を示し、エピトープは遺伝子変異が多発する膜タンパク質ヘマグルチニン(HA)の受容体結合部位近傍の190helixであったため(図1)、ワクチン開発の候補とならなかった。一方5A7はHAの高保存領域にあたる316G、318C、321Wを認識しており(図1)、実際5A7存在下でエスケープミュータント作出を試みたがウイルスを10代継代後も変異株は作出されなかった。また5A7は両系統のウイルスに対し、*in vitro*(図2)ならびに*in vivo*(マウス)で中和能を示した。さらにマウスの感染実験では感染72時間後の5A7投与群において部分

的な治療効果が実証された (図3)。以上の

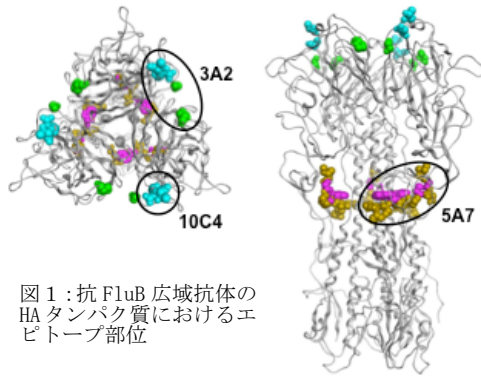


図1: 抗FluB 広域抗体の HA タンパク質におけるエピトープ部位

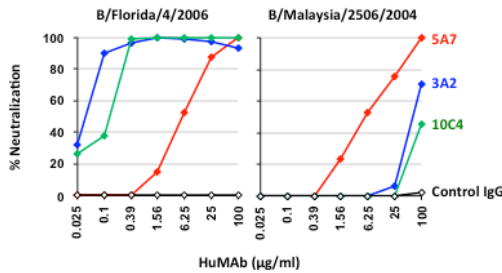


図2: 抗B 抗体の in vitro 中和能

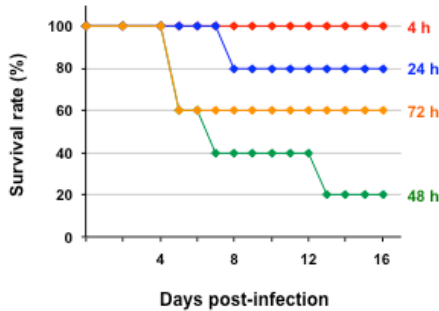


図3: HuMAb_5A7 のマウス治療効果

結果より 5A7 は FluB に対するペプチドワクチンの候補として有効であると考えられた。さらに 5A7 の認識エピトープは新規性があったため特許出願を行った。抗 FluA 抗体は A(H1N1)pdm09 や高病原性 H5N1 を含むグループ I ウイルスを広域に中和することが明らかとなった。現在エピトープを解析中である。

狭域抗体の研究では A(H1N1)pdm09 の HA の抗原決定基 Sb を認識するヒト型中和抗体 5E4 (図4) を利用して A(H1N1)pdm09 の経時的な変異を評価した。2009/10 ならびに 2010/11 の 2 シーズンに大阪府下で分離された計 58 ウイルス株に対する 5E4 の中和能を調べた結果、HI 価ならびに VN₅₀ 価共に 2010/11 シーズンのウイルスでは有意に低下

したことが明らかとなった (図5)。一方標

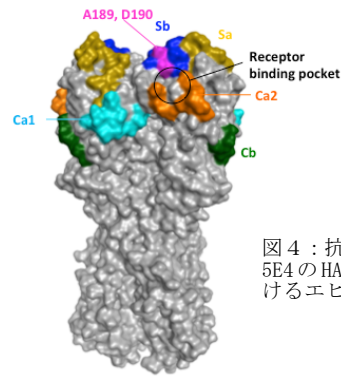


図4: 抗H1N1pdm09 抗体 5E4 の HA タンパク質におけるエピトープ部位

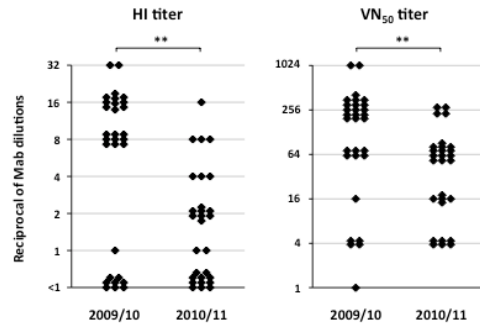


図5: 分離ウイルスに対する 5E4 の HI 価ならびに VN₅₀ 価

準フェレット感染血清を用いた同実験では 2 シーズンの間に有意な差は認められなかった。また 58 株の HA タンパク質のシークエンス解析の結果、2009/10 と 2010/11 シーズンの間に Sb ならびに Ca2 基で positive selection が起こったことが明らかとなった (図6)。以上の結果より大阪府下で流行し

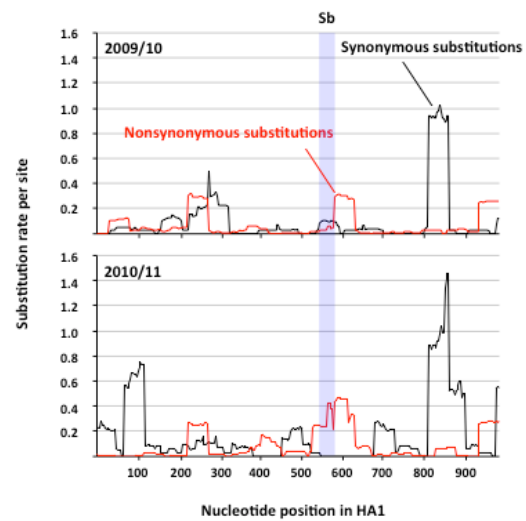


図6: 分離ウイルスの同義置換 (Synonymous substitution) と非同義置換 (Nonsynonymous substitution) の割合

た A(H1N1)pdm09 は 2009/10 と 2010/11 年の間に宿主選択圧の下 Sb 基の変異株が顕著に増加したと示唆された。さらに 2009 から 2013 年の GenBank 登録済の HA アミノ酸配列の比較解析結果から Sa ならびに Sb 基は初期の配列と比較して 2010 年以降変異頻度が有意に上昇したことが判明した。次節流行株は Sb 基変異株が主流となることが予想されるが、2011 年以降大きな流行がないため結論はでておらず今後の追跡調査が必要である。

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 3 件)

(1) Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, 他 9 名, Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus, PLoS PATHOGENS, 2013, 9(2): e1003150, 査読有り
DOI:10.1371/journal.ppat.1003150

(2) Ramadhany R, Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Watanabe Y, Takahashi K, Ikuta K, Nakaya T, Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus, frontiers in MICROBIOLOGY, 2012, 3:128, 査読有り
DOI:10.3389/fmicb.2012.00128

(3) Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Kawashita N, Ramadhany R, 他 7 名, Frequency of D222G and Q223R Hemagglutinin Mutants of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in Japan between 2009 and 2010, PLoS one, 2012, 7(2): e30946, 査読あり
DOI:10.1371/journal.pone.0030946

[学会発表] (計 12 件)

(1) 安木真世、SPYMEG を用いた抗ウイルス完全ヒト型中和抗体の作成～評価例、第 60 回日本ウイルス学会 (招待講演)、大阪、2012 年 11 月 13 日

(2) Yasugi M, Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Kuhara M, Fujiyama K, Okuno Y, Ikuta K, Human Monoclonal Antibodies Broadly Protective against Influenza B Virus, The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2012 年 9 月 12 日

(3) 中村祥子、堀江真行、安木真世、奥崎大介、牧野晶子、本田知之、朝長啓造、A 型インフルエンザウイルス感染によるムチン型糖転移酵素 GALNT3 の発現制御機序と意義の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012

年 11 月 14 日

(4) 金井祐太、安木真世、潘洋、Boonsathorn N、小野健一郎、生田和良、インフルエンザウイルスに対して広い反応性を示すヒト型モノクローナル抗体の分離、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 15 日

(5) 大道寺智、Ibrahim MS、渡邊洋平、安木真世、丸山央峰、益田泰輔、新井史人、大場誠介、本田文江、生田和良、中屋隆明、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒト呼吸器上皮細胞に対して広いトロピズムを示す、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13 日

(6) Ramadhany R, 安木真世、中村昇太、大道寺智、渡邊洋平、高橋和郎、生田和良、中屋隆明、High-throughput amplicon sequencing analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13 日

(7) 潘洋、安木真世、金井祐太、Boonsathorn N、小野健一郎、生田和良、Broadly neutralizing monoclonal antibodies against influenza viruses、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13 日

(8) Yasugi M, Du A, Kawashita N, Koketsu R, Nakaya T, Kuhara M, Boonsathorn N, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Epitope mapping of human monoclonal antibody neutralizing 2009 pandemic influenza A virus, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011 年 9 月 13 日

(9) Yasugi M, Use of a human monoclonal antibody to detect emerging antigenic variants at the antigenic site sb in pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan, Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, Bangkok, Thailand, 2011 年 12 月 2 日

(10) Nakaya T, Yasugi M, Nakamura S, Daidoji T, Ramadhany R, Yang CS, Yasunaga T, Iida T, Horii T, Ikuta K, Takahashi K, 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses with D222G and Q223R hemagglutinin mutations exist as a minor population in human upper airways, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011 年 9 月 13 日

(11) Horie M, Yasugi M, Okuzaki D, Honda T, Tomonaga K, Upregulation of GALNT3 at the early stage of influenza A virus infection through the miRNA pathway, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月13日

(12) Daidoji T, Ibrahim MS, Watanabe Y, Yasugi M, Yang CS, Ikuta K, Nakaya T, Wide-ranged cell tropism of Asian-H5N1 viruses in human airway epithelial cells, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月13日

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: Human Monoclonal Antibodies Broadly Protective against Influenza B Virus

発明者: 安木真世、藤山和仁、生田和良、久原基樹、Boon-Long J、瀨瀬律子

権利者: (株) 医学生物学研究所、(財) 阪大微生物病研究会、タイ王国健康保健省医科学局、大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/000538

出願年月日: 2013年1月31日

国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ等

<http://virology.biken.osaka-u.ac.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安木 真世 (YASUGI MAYO)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号: 40589008