

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870498

研究課題名(和文) 高病原性鳥インフルエンザ抵抗性家畜開発のための細胞内免疫法の確立

研究課題名(英文) Establishment of intracellular immunization for the development of influenza-resistant livestock

研究代表者

藤本 佳万 (Fujimoto, Yoshikazu)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20613631

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内部蛋白質に対する細胞内抗体を発現させた培養細胞およびトランスジェニックマウスにおけるウイルス感染抵抗性の検討を行った。細胞内抗体発現培養細胞において、様々な亜型ウイルスに対する増殖阻害効果がみられた。また、細胞内抗体発現トランスジェニックマウスは、高い病原性を示すウイルスの致死感染を回避した。以上の結果から、細胞内抗体は、インフルエンザウイルス感染抵抗性の付与に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To demonstrate antiviral effects of intracellular antibody (intrabody) against internal proteins of influenza A virus in cultured cells and transgenic mice, experimental infections were conducted. In cultured cells expressing intrabody, the propagation of viruses of several subtypes were inhibited. In experimental infections with the mouse-adapted virus, all of transgenic mice expressing intrabody survived during the experimental period. These results indicate that the intrabody is sufficient to confer resistance against influenza A virus infections.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：インフルエンザウイルス 感染抵抗性 細胞内抗体 トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトや家畜への感染源は家禽であるため、家禽での発生減少は高病原性鳥インフルエンザ流行と新型インフルエンザウイルス出現の阻止に重要である。本病による被害の拡大を防ぐためには、ウイルス感染した家禽を早期に摘発・淘汰することが最善の方法である。様々な亜型の鳥インフルエンザウイルスが常在している中国・東南アジア諸国ではワクチン接種による防疫対策が試みられている。しかし、全ての家禽にワクチンを接種するためには多大な労力と時間を必要とし、また、これら家禽全てがウイルス感染に対抗するために十分な免疫を獲得するかは不明である。さらに、ワクチン接種された家禽体内では主に表面蛋白質である HA および NA に対する抗体価が上昇するが、この方法による免疫家禽はウイルス感染を完全に防ぐことは出来ないため、様々な表面蛋白質抗原の変異ウイルスを出現させる要因となっている。このような背景のもと、近代的な施設で衛生的に家禽を飼育管理することが困難な地域においては、生まれながらにウイルス感染に対して抵抗性を持つ家禽の導入が最も有効であるという着想に至った。

A 型インフルエンザウイルス内部蛋白質のうち、3 種類のポリメラーゼ蛋白質 (PB1、PB2、PA) は、ヘテロ 3 量体 RNA ポリメラーゼ複合体を形成し、ウイルス遺伝子の転写および複製を行う。そのため、これらポリメラーゼ蛋白質は、単独で機能する HA および NA と比べて抗体の選択的圧力による抗原変異の可能性が低いと考えられる。また、PB1 および PB2 には様々な亜型ウイルス株に共通するアミノ酸配列領域が多く存在するため、抗体による機能阻害の標的蛋白質として適していると考えられる。本研究では、抗ポリメラーゼ細胞内抗体によるウイルス遺伝子の転写・複製阻害原理を利用した、新たな方法による鳥インフルエンザ抵抗性家禽開発のための基礎研究を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、抗原亜型に関係なく鳥インフルエンザウイルス感染に抵抗性を示す家禽の作製である。今回の計画では、その基礎研究として、PB1 および PB2 に対するモノクローナル抗体遺伝子をコードする cDNA をインフルエンザウイルス高感受性の MDCK 細胞に導入し、発現細胞内抗体によるウイルス感染抵抗性の付与を目的とする。また、抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおける、インフルエンザウイルス感染抵抗性についても検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内抗体発現細胞のインフルエンザウイルスに対する感染抵抗性の解析

#### 抗 PB1 および抗 PB2 モノクローナル抗体発現細胞の樹立

抗 PB1 および抗 PB2 モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子 cDNA を増幅した。cDNA を用いて、ニワトリ アクチンプロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子を含む抗 PB1 および抗 PB2 抗体発現プラスミドを構築した。

構築プラスミドを MDCK 細胞に導入し、G418 で遺伝子が導入された細胞株を選択樹立した。各細胞株について細胞内抗体の発現をウエスタンブロットおよび ELISA により確認した。また、抗体発現量の多い細胞株を使用して、インフルエンザウイルス感染抵抗性の検討を行った。

#### 一本鎖抗体発現細胞の樹立

抗 PB1 および抗 PB2 抗体の一本鎖抗体遺伝子 cDNA を PCR により増幅した。ウイルス遺伝子の転写・複製の場である核内への移行を容易にするため、増幅した一本鎖抗体遺伝子 cDNA には核内移行シグナル配列を付加した。上記と同様にプラスミド構築および一本鎖抗体発現 MDCK 細胞の選択樹立を行った。

#### 細胞内抗体発現細胞の感染抵抗性

樹立した細胞株のウイルス感染抵抗性を検討するため、H5N3、H11N9、H1N1 および H3N2 亜型ウイルスを用いた TCID<sub>50</sub> 試験およびプラーク試験を実施した。また、感染細胞からサイトゾルおよび核分画を抽出し、ウエスタンブロット法にて各分画に含まれるウイルスポリメラーゼ蛋白質の半定量を行った。

### (2) 細胞内抗体発現トランスジェニックマウスのインフルエンザウイルス感染抵抗性

#### 細胞内抗体発現トランスジェニックマウスの作製

抗 PB2 抗体発現細胞の樹立に使用したプラスミドから transgene として用いる DNA 断片を精製後、C57BL/6 マウス受精卵前核にマイクロインジェクション法で注入し、トランスジェニックマウスを作製した。導入遺伝子の確認は、マウス尾から抽出した DNA を用いて PCR で確認した。また、インフルエンザウイルス内部蛋白質である NP に対するモノクローナル抗体を発現するトランスジェニックマウスを作製するため、ニワトリ アクチンプロモーターおよび抗 NP モノクローナル抗体遺伝子 cDNA を含むプラスミドを構築後、

上記と同様に transgene の受精卵への遺伝子導入を行った。導入遺伝子が子孫に伝達されることを確認後、抗体発現トランスジェニックマウスを系統化した。

#### トランスジェニックマウスのインフルエンザウイルスに対する感染抵抗性

樹立したトランスジェニックマウスのウイルス感染抵抗性を検討するため、A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株, H1N1 亜型)を用いた感染実験を実施した。500pfu/匹のウイルス液を経鼻接種後、14 日間マウスの症状を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1)細胞内抗体発現細胞のインフルエンザウイルスに対する感染抵抗性の解析

モノクローナル抗体遺伝子を MDCK 細胞に導入した結果、抗 PB2 抗体を恒常発現する複数の細胞株が得られた。一方、抗 PB1 抗体を恒常発現する細胞株は得られなかった。複数亜型のインフルエンザウイルスを用いた感染実験(TCID<sub>50</sub>)の結果、抗 PB2 抗体発現細胞株(αPB2/MDCK)では、全ての亜型ウイルスの増殖を抑制する事が明らかとなった(図 1)。プラーク試験においても、野生型細胞と比較して、抗体発現細胞ではウイルスのプラーク形成の阻害およびプラークサイズの縮小が観察された。

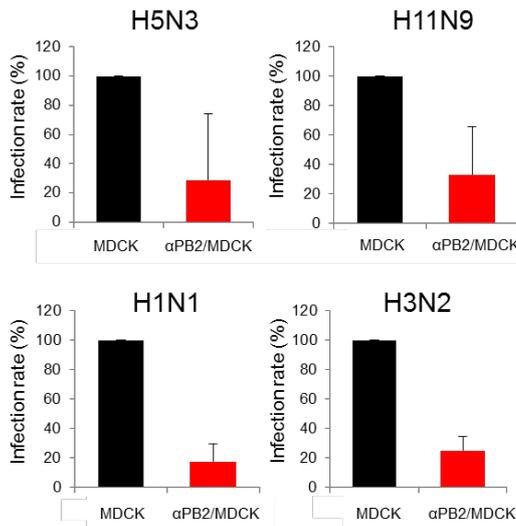


図 1. 抗 PB2 抗体発現 MDCK 細胞の複数亜型インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性

さらに、ウイルス感染後の野生型 MDCK と比較して、抗体発現細胞では細胞質内で新規合成された PB2 の核内移行が阻害されている事が明らかとなった(図 2)。以上の結果から、抗 PB2 細胞内抗体は、インフルエンザウイル

スの PB2 核内移行を阻害し、様々な亜型ウイルスに対して感染抵抗性を宿主細胞に付与する事が示された。

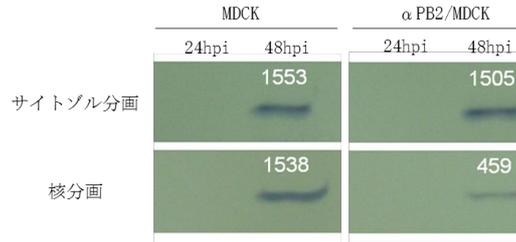


図 2. ウイルス感染後の抗 PB2 抗体発現 MDCK 細胞における PB2 の核内移行阻害

一方、抗 PB1 および抗 PB2 一本鎖抗体を発現する MDCK 細胞株を樹立し、感染実験を行った結果、両細胞株とも感染抵抗性は示さなかった。両細胞とも一本鎖抗体の発現は観察されたものの、抗体が核に局在している細胞は僅かであったことから、より抗体が核移行しやすいシグナル配列を選択する必要があると考えられた。

##### (2)細胞内抗体発現トランスジェニックマウスのインフルエンザウイルス感染抵抗性

抗 PB2 抗体恒常発現細胞の樹立に使用したプラスミドから精製 transgene DNA 断片を調製後、C57BL/6 マウス受精卵前核にマイクロインジェクション法で注入し、受精卵を偽妊娠マウス卵管に移植した。しかし、抗 PB2 抗体遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスを得る事は出来なかった。

代替方法として、インフルエンザウイルス内部蛋白質である NP に対する 2 種類のモノクローナル抗体発現プラスミドを構築後、上記と同様に抗 NP 抗体遺伝子導入トランスジェニックマウスの作製を試みた。その結果、抗 NP 抗体遺伝子導入トランスジェニックマウスを各 2 系統ずつ樹立する事に成功した。また、各系統マウスのマウス胎児線維芽細胞を用いた蛍光抗体法および ELISA 法により、全ての系統マウスの細胞内には、NP 抗原に特異的結合する抗体が発現している事が確認された。このうち、最も抗 NP 抗体の発現量の高いマウス系統を用いて、PR8 株感染実験を実施した。観察期間中、野生型マウスの多くが死亡した一方、全てのトランスジェニックマウスは生存した(図 3)。また、トランスジェニックマウスの体重減少率は、野生型マウスよりも明らかに小さいことが明らかとなった(図 3)。

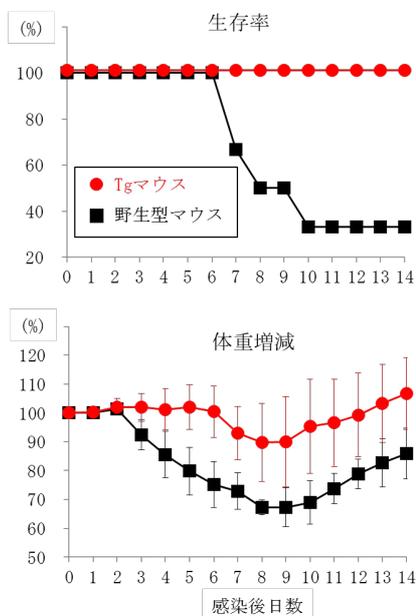


図 3. 細胞内抗体発現トランスジェニックマウスのインフルエンザウイルス感染抵抗性

本研究では、ウイルスポリメラーゼ蛋白質に対する細胞内抗体を発現する培養細胞が、様々な亜型インフルエンザウイルス感染に抵抗性を示すことを明らかにした。また、in vivo においても、ウイルス内部蛋白質である NP に対する細胞内抗体を発現するマウスは、H1N1 亜型ウイルス感染抵抗性を示すことを明らかにした。今後、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを含む様々な亜型ウイルス感染に対する、細胞内抗体発現トランスジェニックマウスの抵抗性を明らかにし、鳥インフルエンザ抗病性家禽開発に繋がる成果が得られることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yoshikazu Fujimoto, Kinuyo Ozaki, Masahiro Maeda, Ken-ichi Nishijima, Hiroki Takakuwa, Koichi Otsuki, Hiroshi Kida, Etsuro Ono, Resistance to influenza A virus infection in transformed cell lines expressing anti-PB2 monoclonal antibody, Veterinary Journal, 2013, 198, 487-493, 査読有,  
DOI:10.1016/j.tvjl.2013.09.019

[学会発表](計 1 件)

藤本 佳万、尾崎 絹代、前田 雅弘、西島 謙一、高桑 弘樹、大槻 公一、喜田 宏、

小野 悦郎、抗 PB2 細胞内発現単クローン抗体の A 型インフルエンザウイルスに対する感染抵抗性、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日、岐阜大学 (岐阜市)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤本 佳万 (FUJIMOTO YOSHIKAZU)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：20613631