

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2019

課題番号：26461516

研究課題名(和文)人工ヒト型抗ノロウイルス抗体を利用した、感染防御・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prophylaxis and therapy in norovirus infection with artificial antibodies

研究代表者

守口 匡子 (Moriguchi, Kyoko)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：60298528

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)：申請者はファージディスプレイ法によって抗Narita 104株(GII.4)ファージ抗体や抗Chiba 407株(GI.4)ファージ抗体を46クローン単離し、それらのうちの4クローンが、交差反応性抗体(GI内交差反応性1クローン、GII内交差反応性2クローン、そして、GI-GII間交差反応性1クローン)であること、HuNoVのレセプター候補分子である組織・血液型抗原へのウイルス粒子吸着阻害活性を有していることを確認した。また、この4クローン以外の25のGII.4特異的抗体に関しても、組織・血液型抗原へのウイルス吸着阻害活性があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノロウイルス感染症は冬季下痢症原因の第一位となっており、高齢者施設や学校、食堂での集団感染事例も多く、大きな社会被害をもたらすが、現在、有効な抗ウイルス薬やワクチンの開発は研究途上にある。健常人であれば予後は良いものの、ウイルスの感染力は強く、高齢者施設での発生は死亡者を出すこともあり、また、ひとたび院内感染が起きると、免疫抑制状態にある患者に慢性的な症状を引き起こすため、その対策が急がれている。このような状況下、中和活性のある抗ノロウイルス人工抗体を開発することは、ヒト血清につきまとう感染因子混入の危険性や倫理面の問題を回避しつつ受動免疫治療を可能にするため、意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：The 46 clones of anti-Narita 104 strain (GII.4) and anti-Chiba 407 strain (GI.4) phage antibody were isolated by the phage display method, and 4 clones among them were cross-reactive antibody (GI Internal cross-reactivity 1 clone, GII internal cross-reactivity 2 clones, and GI-GII cross-reactivity 1 clone), and virus particle adsorption inhibitory activity on tissue / blood group antigens that are HuNoV receptor candidate molecules was confirmed to have. In addition, it was confirmed that 25 GII.4-specific antibodies other than these 4 clones also have virus adsorption inhibitory activity on tissue / blood group antigens.

研究分野：ウイルス学

キーワード：人工抗体 受動免疫 抗ノロウイルス抗体 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

感染性胃腸炎や食中毒の病原ウイルスであるヒトノロウイルス (HuNoV) は genogroup I と II に分類され、さらに genogroup I には 1-15 の、genogroup II には 1-18 の genotype が報告されており、多様性に富むウイルスである。その感染力は強く、乳幼児から成人まで幅広く感染し、大きな社会被害をもたらしている。しかし、HuNoV の感染・増殖が可能な再現性のある培養細胞系は確立されておらず、基礎的研究はもとより、臨床応用に繋がるウイルス学的研究もほとんど進んでいない。我々は、多数の抗 HuNoV 抗体の単離とそれらが認識するエピトープの同定は、中和能を有する抗体の選別や、ウイルスワクチンの設計、更には、ウイルスレセプターや増殖機序の解明に寄与する所が大きいと考える。加えて、それらが人工抗体であれば、大量生産が容易で、血液製剤による感染性因子混入の危険性を回避できるため、安価なウイルス検出キット開発はもとより、受動免疫による治療や予防にも有用である。そこで、HuNoV に対する抗体を網羅的に単離・定性して、交叉反応性中和抗体の選別や、ウイルス感染・増殖機序解明を目指したいとの着想に至った。

2. 研究の目的

HuNoV 感染症に対し、ヒト型ファージ抗体を用いた受動免疫による治療や予防を可能にする、それら抗体を利用した、簡便で安価なウイルス検出キットを開発する、それら抗体が認識するエピトープを同定し、HuNoV ワクチンの設計を行う。また、交叉反応性や中和を含む抗 HuNoV 抗体を網羅的に単離し、それらを定性することが、本研究の目的である

3. 研究の方法

(1) genogroup I/genotype 4 (GI.4) タイプの Chiba407 (CV) 株、および、GII.4 タイプの Narita104 (104) 株のウイルス様空粒子 (VLP、それぞれ rCV と r104) を抗原に用い、数十人の扁桃、脾臓、骨髄、臍帯血、末梢血等の B 細胞リッチな組織より作成したヒト由来抗体ライブラリーから単離された 46 クローンの抗体の、VLP への吸着活性を検討する。

(2) rCV と r104 の他に、r124(GI.1)、r258(GI.2)、r645(GI.3)、rW18(GI.8)、r485(GII.1)、r18-3(GII.3)、r336(GII.3)、r754(GII.5)、r445(GII.6)、r10-25(GII.7)、r76(GII.12)、r47(GII.14) を抗原に用い、ELISA 法にて、単離された抗 HuNoV 抗体の交叉反応性を詳細に検討する。

(3) 単離された抗 HuNoV 抗体が認識する、ウイルス構造タンパク質上の抗原エピトープを、粒子形成タンパク質 VP1 をそのサブドメイン毎に大腸菌で発現させて精製し、それらを抗原として、ELISA 法にて同定する。

(4) 単離された抗体と HuNoV レセプターの候補分子である組織-血液型抗原 (HBGA) との吸着競争実験を行い、中和抗体の可能性を探る。

(5) 単離された抗 HuNoV 抗体が、実際に生体防御に関わっているかを、健常人血清サンプルとの結合阻害実験で検証する。具体的には、幅広い年齢層の健常人血清サンプルと rCV、あるいは、r104 を先に反応させ、その後、ファージ抗体が VLP に吸着するか否かを ELISA 法にて検証する。

4. 研究成果

(1)(2) GI.4 タイプの rCV を抗原に用いて単離された 17 クローンのうち、CV-1A5 が GI-GII 間の、CV-2F5 が GI 内の交差反応性抗体で、残り 15 クローンが GI.4 特異的抗体であることがわかった。また、GII.4 タイプの r104 を抗原に用いて単離した 29 クローンの抗体のうち、12A11 が GII 内の、そして 12B10 が GII.1,4,6,7,間の交差反応性抗体で、他の 27 クローンは GII.4 特異的抗体であることが判明した。

(3) この実験は困難を極めたが、12A11 については、P1C 領域であることが判明した(図1)。

(4) 交差反応性が確認された 4 抗体と GI.4 特異的、および GII.4 特異的抗体の軽 6 クローンについて詳細な解析を行った。その結果、ウイルスがレセプターとして利用されていると報告されている組織血液型抗原全てに対して、いずれの抗体も吸着阻害活性があることが判明した。ただし、その活性は、特異的抗体のほうが交差反応性抗体よりも高い傾向にあった。

(5) 交差反応性抗体に関しては、同じエピトープを認識する抗体が含まれている血清は全年齢層において数%であった。一方、特異的抗体は、80%前後の血清に同じエピトープを認識する抗体が含まれていることが判明し、その割合は、年齢が上がるほど高い傾向にあった。

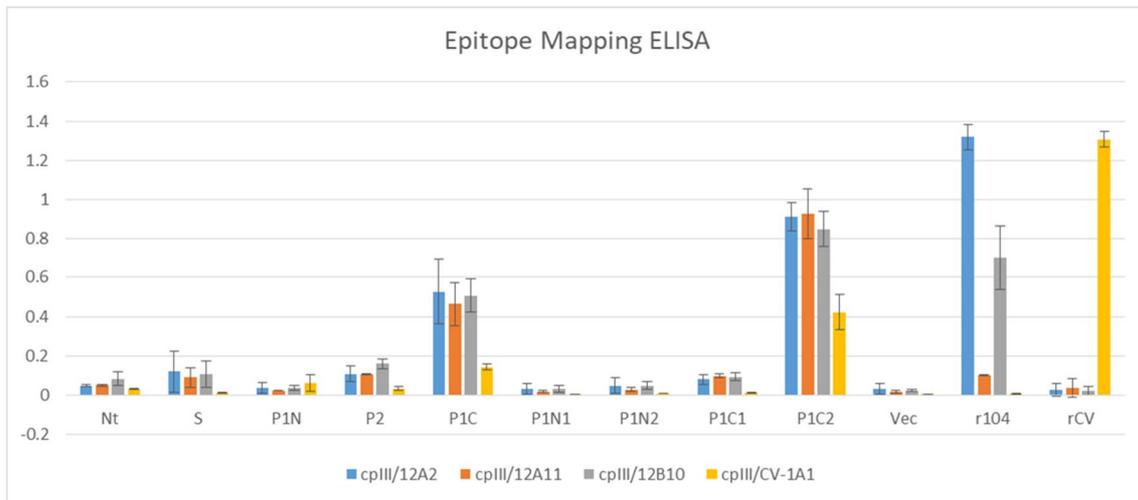


図1 メジャーなカプシドタンパク質 VP1 をサブドメイン毎 (Nt, S, P1N, P2, P1C, P1N1, P1N2, P1C, そして P1C2) に分割してレコンビナントタンパク質を作成し、どの領域と各抗体が反応するかを ELISA にて確認した。Vec は陰性コントロール、r104 と rCV は陽性コントロール。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 T. Kawahara, Y. Makizaki, Y. Oikawa, Y. Tanaka, A. Maeda, M. Shimakawa, S. Komoto, K. Moriguchi, H. Ohno, K. Taniguchi	4. 巻 27
2. 論文標題 Oral administration of Bifidobacterium bifidum G9-1 alleviates rotavirus gastroenteritis through regulation of intestinal homeostasis by inducing mucosal protective factors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS one	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371	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 H. M. Thu, T. W. Myat, M. M. Win, K. Z. Thant, S. Rahman, K. Umeda, S. V. Nguyen, F. C. Icatlo, Jr, K. Higo-Moriguchi, K. Taniguchi, T. Tsuji, K. Oguma, S. J. Kim, H. S. Bae, H. J. Choi	4. 巻 37(1)
2. 論文標題 Chicken egg yolk antibodies (IgY) for prophylaxis and treatment of rotavirus diarrhea in human and animal neonates: A concise review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Korean J. Food Sci. An.	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） https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.1	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 T. Ide, S. Komoto, K. Higo-Moriguchi, K. W. Htun, Y. Y. Myint, T. W. Myat, K. Z. Thant, H. M. Thu, M. M. Win, H. N. Oo, T. Htut, M. Wakuda, F. E. Dennis, K. Haga, Y. Fujii, K. Katayama, S. Rahman, S. V. Nguyen, K. Umeda, K. Oguma, T. Tsuji, K. Taniguchi	4. 巻 May 4
2. 論文標題 Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Myanmar	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0124965	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 T. Ide, K. Higo-Moriguchi, S. Komoto, K. W. Htun, Y. Y. Myint, T. W. Myat, K. Z. Thant, H. M. Thu, M. M. Win, H. N. Oo, T. Htut, S. Rahman, S. V. Nguyen, K. Umeda, K. Oguma, T. Tsuji, K. Taniguchi	4. 巻 Sep. 11
2. 論文標題 High prevalence of G12 human rotaviruses in children with gastroenteritis in Myanmar	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2015.267	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 Komoto Satoshi, Pongsuwanna Yaowapa, Tacharoenmuang Ratana, Guntapong Ratigorn, Ide Tomihiko, Higo-Moriguchi Kyoko, Tsuji Takao, Yoshikawa Tetsushi, Taniguchi Koki	4. 巻 195
2. 論文標題 Whole genomic analysis of bovine group A rotavirus strains A5-10 and A5-13 provides evidence for close evolutionary relationship with human rotaviruses	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Veterinary Microbiology	6. 最初と最後の頁 37 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetmic.2016.09.003	査読の有無 無
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 Ashiba Hiroki, Sugiyama Yuki, Wang Xiaomin, Shirato Haruko, Higo-Moriguchi Kyoko, Taniguchi Koki, Ohki Yoshimichi, Fujimaki Makoto	4. 巻 93
2. 論文標題 Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance-assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 260 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2016.08.099	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 Yasuura Masato, Shirato Haruko, Higo-Moriguchi Kyoko, Fujimaki Makoto	4. 巻 58
2. 論文標題 Detection of norovirus-like particles with an external force-assisted near-field illumination biosensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 071005 ~ 071005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/1347-4065/ab29e2	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----