

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461517

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス亜型間交叉反応性中和抗体の探索とそのエピトープ解析

研究課題名(英文) Isolation and epitope analysis of broadly neutralizing antibodies against Influenza viruses

研究代表者

大島 信子 (Ohshima, Nobuko)

藤田保健衛生大学・産学連携推進センター・講師

研究者番号：60387694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、A型H3N2インフルエンザウイルスの抗原変異株に交差反応するモノクローナル抗体をヒトファージ抗体ライブラリーから単離し解析した。その抗体群の中に、B型にも交差反応する抗体が存在しており解析を行ったが、ウイルス中和抗体のターゲットであるウイルスヘマグルチニンに対する抗体である確証は得られなかった。本研究では、使用した複数のA型H3N2抗原変異株全てに交差反応する別の抗体の単離にも成功している。これら抗体の解析によりA型H3N2株内で保存されているエピトープが決定されれば、将来的にはそのエピトープを認識する抗体を誘導することのできるワクチン開発につながると思っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, monoclonal antibodies that cross-react with antigenic variants of type A H3N2 influenza virus were isolated from a human phage antibody library and analyzed. The antibodies that bind to both type A and B influenza vaccines are included in these isolated antibodies, but there was no confirmation that the antibodies recognize hemagglutinin which is a target of virus neutralizing antibody. We also succeeded in isolating another antibodies cross-reactive with all antigenic variants of type A H3N2 influenza virus used in this study. If the epitope conserved in type A H3N2 virus strains is determined through the analysis of these antibodies, we believe that in the future it will lead to the development of a vaccine capable of inducing antibodies recognizing the epitope.

研究分野：分子生物学

キーワード：交差反応性 ファージ抗体ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの中和抗体には、ウイルス膜タンパクヘマグルチニン(HA)の抗原連続変異に伴い中和できなくなる短期型の抗体と、抗原連続変異やウイルスの亜型の違いに関係なく幅広くウイルスを中和できる抗体の存在が明らかになっている。短期型抗体のHA上のエピトープは、HA頭部の宿主との結合領域周辺に存在する 경우가多く、変異の頻度が非常に高いことからウイルスを中和することのできる期間が短期となる。一方、亜型間交差反応性の中和抗体は、H1N1型の属するグループ1では、各亜型のHA幹部領域にある非常に保存度の高い部位を認識していることが報告されている。我々の研究においても、グループ1に属するウイルス株を幅広く中和することのできる抗体の単離に成功している。そのエピトープは上述の抗体とほぼ同じ位置に存在することを示唆するデータが得られており、H1N1型ウイルスが属するグループ1には、抗原連続変異や亜型に左右されることなく中和することができる、亜型間交差反応性の抗体を誘導することのできるエピトープが、HAの幹部領域に存在すると考えられる。

2. 研究の目的

H3N2型ウイルスが属するグループ2では、グループ1のように普遍性が考えられるエピトープは同定されていない。H3N2型は依然として季節性ウイルス株として毎年流行することから、そのようなエピトープを持つ交叉反応性の中和抗体がグループ2においても誘導できれば、生体内での長期的なウイルス感染予防効果が期待できることになる。

H1株でのスクリーニング結果から、H3型の属するグループ2においてもHA亜型間で保存されている領域を認識し、グループ2内の複数の亜型ウイルス株を中和可能な抗体がヒト体内に誘導されている可能性は高い。H3N2型でのスクリーニングにおいて、比較的保存度の高い領域に対する中和抗体の単離が可能であることを証明してきたことから、これまでに多数の中和抗体単離に成功してきたヒトファージ抗体ライブラリーのスクリーニング技術と解析技術を用い、グループ2での亜型間交叉反応性の中和抗体を単離し、そのエピトープの解析を目的とした。

3. 研究の方法

1947年生まれのH3株インフルエンザワクチン接種歴のないドナーに1度だけ季節性ワクチンを接種後に作製したヒトファージ抗体ライブラリーを、複数のH3N2型のインフルエンザワクチン株を抗原として用いてスクリーニングし、多種類の抗HA抗体を単離する。ELISAによる各抗体クローンのワクチン株への結合活性確認後、塩基配列解析による抗体配列の決定、ウエスタンブロットティングによる抗HA抗体の選別、H3N2型のドリフ

ト株に対する株特異性の決定、およびウイルス株に対する中和活性を測定する。

4. 研究成果

(1) A型H3N2株に対する抗体の単離

本研究では、1947年生まれの人からの200mL血液由来の10の9乗レベルのファージ抗体ライブラリーを使用している。季節性ワクチンは、ライブラリー作製時にブーストをかけるために初めて接種しているのみであり、また、長期にわたりインフルエンザを発症していないことから、目的の抗体を単離するために最適なライブラリーであると判断し、使用した。このライブラリーを単離年の異なる5種類のA型H3N2株(1968、1985、1999、2007、2012年株)のインフルエンザスプリットワクチン液にてスクリーニングを実施し、1072クローンを単離した。各抗体クローンの、スクリーニングに使用したワクチン液に対する結合活性を検討したところ、活性を示したクローンは668個であった。さらに、ウイルスの構成タンパクである核タンパク(NP)を抗原に用いてELISAを実施したところ、198クローンが抗NP抗体であった。したがって、残りの470クローンを以降の解析対象とした。

(2) 単離した抗体の重鎖アミノ酸配列の解析

単離した470個の抗体の重鎖のアミノ酸配列を解析したところ、470個の抗体は133種類の抗体からなることが判明した。抗体の重鎖領域の中で抗原との結合に最も重要とされるのは相補性決定領域3(CDR3)であるが、この領域は各抗体間のアミノ酸配列が最も異なる部位であり、抗体の多様性を決定づけている領域である。この133種類の抗体を、CDR3領域のアミノ酸配列の同一性を基に分類したところ、90種類のCDR3領域が存在することが判明した。さらに過去の研究において、重鎖のCDR3領域内での変異による類似アミノ酸配列を持つ抗体は、軽鎖のアミノ酸配列に違いがあってもワクチン株に対する交叉反応性は基本的には同じである場合が多かった。したがって、CDR3領域の変異関係にあると考えられる類似アミノ酸配列による分類を行うことにより、同じ交叉反応性の抗体をまとめることが可能である。そのCDR3領域内のアミノ酸変異による類似性を考慮してさらにグループ化を行うと、90種類のCDR3領域は65種類のグループに分類された。本研究でのスクリーニングにより、大きく分けると65種類のA型H3N2株に対する抗体クローンが単離されたことになる。

(3) A型H3N2抗原変異株に対する交叉反応性の確認

本研究で単離した抗H3N2抗体133種類のA型H3N2ウイルス株に対する交叉反応性を、6種類の抗原変異株に対する結合活性で評価した。さらに、A型H1N1型に対する結合活性も測定し、A型ウイルス全般にわたって結合

可能な抗体の存在の有無も検討した。その結果、テストした A 型 H3N2 株全般に結合活性を示したのは、弱い活性のものも含めると 48 種類単離できた。これら 48 種類の抗体は、CDR3 領域の類似性から 4 グループに分けられており、そのうちの 43 種類が同一グループであった。また、A 型 H1N1 株にまで結合活性を示す抗体も 8 種類単離された。これらは、7 種類の CDR3 領域の抗体群で構成されていた。したがって、A 型 H3N2 株に対し幅広く交差反応する抗体の候補としては 4 種類、H3N2、H1N1 型を含む A 型株に対し幅広く交差反応性を示す抗体の候補は 7 種類単離できたことが判明した。

(4) 幅広い交差反応性を示す抗体の抗原確認

上述の抗体は全て、核タンパクに対する結合活性を ELISA の系では検出することできなかった抗体群である。(3) で判明した幅広い交差反応性抗体の抗原を決定する最初の手段として、ワクチン液を抗原にしてのウエスタンブロッティングを実施した。同一グループに分類された抗体は、ほぼ同じ交差反応性を示していることから、各グループで代表抗体を選んだ。抗 H3 抗体は 4 抗体、抗 A 型抗体は 8 抗体に対し、ウエスタンブロッティングを実施した結果、抗 A 型抗体 1 種類を除いては、全ての抗体で HA の位置にバンドが検出できた。HA は、インフルエンザウイルス中和抗体のターゲットであり、これら抗体が抗 HA 抗体である可能性が示唆されたことから、抗原が HA であることを直接証明する必要がある。

(5) B 型ウイルス株でのライブラリースクリーニング

一方で、B 型インフルエンザウイルスに対する中和抗体を単離する目的で、本研究で使った同じファージ抗体ライブラリーを B 型ウイルスワクチン液でスクリーニングした際、A 型、B 型ウイルスワクチン液に結合活性を示す抗体が単離された。その重鎖配列を解析した結果、上述の A 型インフルエンザウイルス株に幅広く交差反応する抗体と同じ又は類似するアミノ酸配列を持つ抗体が単離された。このことから、A 型 H3N2 株の抗原変異株に対し交差反応する抗体よりも、さらに幅広い交差反応性抗体の解析を優先させた方が、様々な型のあるインフルエンザウイルス全般に対する抗体の重要な情報が得られる可能性があり、かつ、将来のワクチン開発にも有用であると考え、B 型株でも単離された同じ重鎖アミノ酸配列を有する抗体を優先して解析することとした。

(6) 赤血球凝集抑制(HI)試験

赤血球は、インフルエンザウイルス液存在下では凝集反応を示す。抗 HA 抗体存在下でその凝集反応を抑制する能力があるかどうかを測定することにより、抗体がウイルス HA

と赤血球との結合を阻害する能力を持つかどうかかわかる。そこで、モルモットの赤血球を用いて各抗体の HI 活性を測定した。その結果、全ての抗体において HI 活性は検出できず A 型 B 型のスクリーニングで単離された抗体がウイルス HA と赤血球の結合を阻止する能力がないことが判明した。

(7) 細胞表層上に発現させたりコンビナント HA に対する反応性

これら抗体のワクチン液でのウエスタンブロッティングでは HA の位置にバンドが検出されたものの、HA に結合していることを直接証明していなかった。そこで、293T 細胞の表層上に HA を発現させ、細胞免疫染色を行った。全ての抗体が、細胞表層上に発現させた HA にはポジティブなシグナルを検出することができず、ウエスタンの結果を裏付けることができなかった。したがって、リコンビナント HA に point mutation を導入してのエピトープ解析を行うことも不可能となった。

(8) 単離抗体によるワクチン液の免疫沈降

ウエスタンブロッティングと蛍光免疫染色での矛盾を明らかにするため、単離した抗体によるワクチン液の免疫沈降を実施し、サンプルを抗 HA 抗体によるウエスタンブロッティングに供した。その結果、コントロール抗体(抗口タウイルス抗体)と比較して HA の 2 量体 3 量体部分にあたると思われるバンドが濃くなっていることから、HA が含まれるフラクションが各抗体に結合する可能性が示唆された。しかしながら、明確に HA に対する抗体であるとの結果は得られなかった。

(9) まとめ

本研究では、複数個の幅広い交差反応性抗体の単離に成功し、その中でもより広い交差反応性を持つ抗体が有用であると考えたことから、その抗体の解析を中心に行った。このような抗体は世界でも珍しく、確実に中和する抗体でありかつ、そのエピトープが判明すれば、そのような抗体を誘導することのできるワクチン開発へとつながる可能性があった。しかしながら、本研究で単離された抗体は、HA スプリットワクチン液でも比較的多く含まれる NP に対する抗体ではないことは判明したものの、中和抗体のターゲットである HA に対する抗体であるとの確実な結果を得ることは難しく、抗原のエピトープ解析には結びつかなかった。本研究では、これ以外にも A 型 H3N2 型の抗原変異株に幅広く結合する抗体の単離にも成功しているが、解析が不十分な状況である。H1N1 型を含む A 型グループ 1 ウイルス株を幅広く中和する抗体のエピトープは非常によく知られており、そのエピトープをターゲットとする抗体を誘導するためのワクチンの研究が進んでいるが、H3 を含むグループ 2 のウイルス株を幅広く中和する抗体の報告は少なく、したがって、そ

のエピトープにも普遍性は今のところ見いだせていない。本研究で単離された抗体の解析は、そこにつながる可能性があることから、非常に重要であると考えており、今後の課題となった。

また、インフルエンザワクチン液でファージ抗体ライブラリーをスクリーニングする際、ライブラリーとワクチン液の組み合わせによっては、HA スプリットワクチン液であっても抗 NP 抗体の単離が主となり、抗 HA 抗体の単離がほとんどできないことがあった。これは、この方法論で抗インフルエンザ抗体を単離する際の大きな問題点であり、本研究においても当初、抗体単離の際にそのような状況が発生した。しかしながら、本研究での実施過程において克服することができ、効率的な単離につながる手法となったことは大きな前進であり、本研究でのもう一つの成果となった。

<引用文献>

Sui J et al, Nat Struc Mol Biol, 2009, **16**, 265-273

Ekiert DC et al, Science, 2009, **324**, 246-251

Ohshima N et al, PLOS ONE, 2014, **9**, Issue 2, e87305

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 1 件)

Daisuke Hirano, Nobuko Ohshima, (他 5 名), Three Types of Broadly Reacting Antibodies against Influenza B Viruses Induced by Vaccination with Seasonal Influenza Viruses, Journal of Immunology Research, 査読有, Vol. **2018**, Article ID 7251793, 2018, <https://doi.org/10.1155/2018/7251793/>.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 信子 (OHSHIMA, Nobuko)

藤田保健衛生大学・産学連携推進センター・講師

研究者番号：60387694

(2) 連携研究者

平野 大介 (HIRANO, Daisuke)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70767110