

平成 31 年 5 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21214

研究課題名(和文) 抗ヌクレオカプシド蛋白質抗体によるインフルエンザウイルス感染防御メカニズムの解明

研究課題名(英文) The protective mechanism of an anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody against influenza virus infections.

研究代表者

藤本 佳万 (Fujimoto, Yoshikazu)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

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)：抗ヌクレオカプシド蛋白質(NP)抗体の感染防御機構の解明を目的として、本研究課題を実施した。非感染中和抗体による主な抗ウイルス作用は、抗体依存性細胞障害(ADCC)および補体依存性細胞障害(CDC)活性である。ADCCおよびCDC活性に重要な部位を変異させた抗NPモノクローナル抗体遺伝子を導入したトランスジェニック(TG)マウスを作製し、インフルエンザウイルス接種実験を実施した。その結果、野生型マウスと比較してADCC/CDC活性欠損TGマウスでは感染抵抗性が観察された。本研究において、ADCCおよびCDC活性とは異なるメカニズムにより、抗NP抗体は感染防御能を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来発生する鳥インフルエンザの原因ウイルス亜型を予想することは困難である。亜型を問わず感染防御効果を示す万能ワクチンは、緊急時のウイルス感染拡大防止策の有効な手段となることや、罹患家禽と密に接する防疫従事者への感染予防に利用されることが期待される。ヌクレオカプシド蛋白質(NP)には、インフルエンザウイルスに共通した抗原領域が多く保存されているため、万能ワクチンの標的蛋白質として適しているが、その感染防御機序は明らかにはされていない。本研究成果は、抗NP抗体による感染防御機序に関する新たな知見を得られた点に学術的意義があり、NPを標的とした万能ワクチン開発に繋がる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research subject was elucidation of antiviral mechanism of an anti-nucleocapsid protein (NP) antibody against influenza virus infections. It has been known that one of antiviral mechanisms of non-neutralizing antibodies is antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and / or complement-dependent cellular cytotoxicity (CDC) activity. Transgenic (TG) mice expressing an anti-NP monoclonal antibody with mutations at several sites that are important for ADCC and CDC activities were generated, and experimental infections with an influenza virus were performed. As compared to wild type mice, TG mice expressing the ADCC / CDC activity-deficient antibody showed resistance to the viral infection. These results suggested that a different mechanism from ADCC and CDC activities may be responsible for protective effects of anti-NP antibodies against influenza virus infection.

研究分野：病態予防獣医学

キーワード：インフルエンザウイルス トランスジェニックマウス 抗体

1. 研究開始当初の背景

海外諸国では、家禽および哺乳動物における様々な亜型の鳥インフルエンザウイルス感染例が継続的に多数報告されている。鳥類は本ウイルスの主な感染源であるため、家禽における鳥インフルエンザ発生のコントロールは、養鶏産業界の経済的損失の削減のみならずヒトの間で大流行するパンデミックウイルス出現の阻止にも重要である。現在、海外で使用されている鳥インフルエンザワクチンは、ウイルス表面蛋白質の機能を阻害する感染中和抗体の誘導を目的としている。しかし、野外分離ウイルスを用いて開発される現行のワクチン対策では必ず新型インフルエンザウイルス出現の後手に回るため、その流行を防ぐことは困難である。ヌクレオカプシド蛋白質(NP)は、インフルエンザウイルスに共通した抗原領域を多く含むウイルス蛋白質であるため、全ての亜型ウイルスに効果を示すインフルエンザ万能ワクチンの標的蛋白質に適していると考えられる。しかし、抗 NP 抗体はウイルス感染を中和しない為、本抗体を利用したウイルス感染防御に関する研究は注目されていない状況が続いていた。

2. 研究の目的

これまでの研究において、H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザから生還した患者由来抗NP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が、H5N1およびH1N1亜型ウイルスに対する高い感染抵抗性を示すことを明らかにしている。さらに本抗体は、H1～H13亜型ウイルスのNP内に保存された共通抗原領域と特異的に結合することから、ウイルス亜型を問わない新たなワクチン開発や抗体医薬開発に利用できると考えられる。本抗体はウイルス中和活性を示さないことから、その防御メカニズムは抗体依存性細胞障害活性もしくは補体依存性細胞障害活性であることが予想されているものの、詳細な解析は行われていない。そこで、将来のインフルエンザ万能NPワクチン開発に向けた基礎研究として、本研究課題ではインフルエンザ抵抗性を示すトランスジェニックマウスを利用した抗NPモノクローナル抗体による感染防御メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Fc領域変異抗NPモノクローナル抗体遺伝子のクローニング

構築済の抗NPモノクローナル抗体発現プラスミドを用いて、部位特異的変異導入法(Site Directed Mutagenesis Kit)により抗体依存性細胞障害活性および補体依存性細胞障害活性のそれぞれに重要な抗体Fc領域の受容体結合領域遺伝子に任意の変異を導入した。任意の遺伝子変異の導入はシーケンス解析にて確認した。

(2) アミノ酸変異導入抗体におけるNPへの結合性の確認

作製した抗体遺伝子発現プラスミドをCos-1細胞にトランスフェクション後、培養上清中に分泌された抗NPモノクローナル抗体を回収した。回収した抗体が抗原と特異的に結合することを確認するため、大腸菌で発現させたGST融合NP抗原を用いたELISAを実施した。

(3) Fc変異抗 NP モノクローナル抗体発現トランスジェニックマウスの作製

上記で作製したモノクローナル抗体発現プラスミドから、プロモーター領域を含む抗体遺伝子を制限酵素処理で切り出した。マウス受精卵にマイクロインジェクション法により Fc 変異抗体遺伝子を導入し、トランスジェニックマウスを作製した。マウス系統を樹立後に、血清中に NP と結合するモノクローナル抗体が発現していることを ELISA により確認した。

(4) 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実験

作製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を明らかにするため、H1N1 亜型ウイルスを用いた感染実験を実施した。麻酔下のマウスに任意の感染力価のウイルス希釈液を経鼻接種後、2 週間観察を行った。

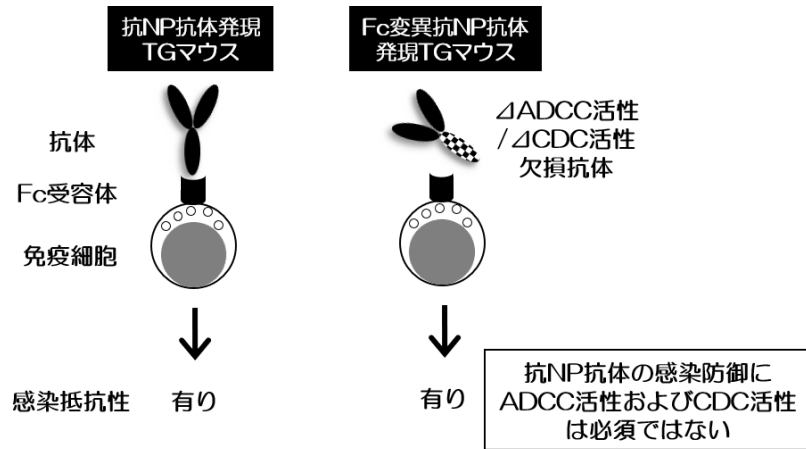
4. 研究成果

抗体依存性細胞障害活性欠損および補体依存性細胞障害活性欠損 (ADCC/ CDC) IgG 抗体発現プラスミドを作製し、培養細胞にトランスフェクションした。培養上清中に分泌された抗体は、NP 抗原と特異的に結合することを ELISA により確認した。その後、プラスミドからプロモーター領域を含む抗体遺伝子を切り出しおよび精製し、C57BL/6 マウスの受精卵前核にマイクロインジェクション法により導入した。その結果、複数のトランスジェニックマウスが得られ、それぞれ系統化を行ったが、F1 マウスに抗体遺伝子が伝達されない系統も確認された。ELISA および遺伝子解析により、安定した ADCC/ CDC IgG を発現するトランスジェニックマウスを 2 系統(系統 A および系統 B) 樹立することに成功した。

系統 A および系統 B マウス血清中における ADCC/ CDC 抗 NP モノクローナル抗体発現量を ELISA により測定した。陽性コントロールとして様々な亜型インフルエンザウイルスに高い感染抵抗性を示す抗 NP モノクローナル抗体発現トランスジェニックマウス系統(C 系統) マウス血清を用い、陰性コントロールとして野生型 C57BL/6 マウスの血清を用いた。その結果、系統 C マウスの血清中モノクローナル抗体発現量は 1.8mg/ml である一方、系統 A および系統 B マウスではともに 0.8mg/ml と少し抗体発現量が低い傾向が見られた。野生型マウス血清中には NP 抗原と結合する抗体は検出されなかった。

これらトランスジェニックマウスを用いて H1N1 亜型インフルエンザウイルスの感染実験を行った。致死性ウイルス力価および非致死性ウイルス力価のウイルス希釈液をマウスに経鼻接種後、生存率および体重変化を 2 週間記録した。その結果、致死性ウイルス力価接種時には野生型、系統 A および系統 B は同様の生存曲線および体重減少率を示したものの、非致死性ウイルス力価接種時には野生型マウスと比較して系統 A および系統 B マウスは体重減少率が有意に抑制された。以上の結果から、抗体依存性細胞障害活性および補体依存性細胞障害活性は、抗 NP モノクローナル抗体の感染防御メカニズムに必須ではないことが示唆された(図 1)。一方、本研究に用いた系統 A および系統 B は、系統 C と比べて抗 NP モノクローナル抗体が血清中に分泌されていないことが、高力価および低力価ウイルス接種試験における感染抵抗性の違いに影響した可能性がある。今後、より ADCC/ CDC モノクローナル抗体を高濃度で血清中に分泌するトランスジェニックマウス系統を樹立し、その感染抵抗性を明らかにすることにより、抗 NP モノクローナル抗体のインフルエンザ感染防御メカニズムを明確にすることが出来ると考えられる。

図 1



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

Fujimoto Y, Kyogoku K, Takeda K, Ozaki K, Yamamoto S, Suyama H, Ono E: Antiviral effects against influenza A virus infection by a short hairpin RNA targeting the non-coding terminal region of the viral nucleoprotein gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 81(3): 383-388, 2019, 査読有

Fujimoto Y, Tomioka Y, Takakuwa H, Uechi G, Yabuta T, Ozaki K, Suyama H, Yamamoto S, Morimatsu M, Mai LQ, Yamashiro T, Ito T, Otsuki K, Ono E: Cross-protective potential of anti-nucleoprotein human monoclonal antibodies against lethal influenza A virus infection. *Journal of General Virology* 97: 2104-2116, 2016, 査読有

(学会発表)(計 2 件)

Yoshikazu Fujimoto, Yukiko Tomioka, Hiroki Takakuwa, Gen-Ichiro Uechi, Toshiyo Yabuta, Kinuyo Ozaki, Haruka Suyama, Sayo Yamamoto, Masami Morimatsu, Mai Q. Le, Tetsu Yamashiro, Toshihiro Ito, Koichi Otsuki, Etsuro Ono. Anti-nucleocapsid protein antibody is sufficient to confer resistance to lethal infection with influenza A viruses of several subtypes in transgenic mice. *International Symposium for Southern China Laboratory Animal Sciences* 2016

藤本 佳万、尾崎 絹代、上地 玄一郎、高桑 弘樹、富岡 幸子、藪田 淑予、陶山 晴香、山本 沙代、森松 正美、伊藤 壽啓、大槻 公一、Le Quynh Mai、山城 哲、小野 悦郎、ヒト由来抗体発現トランスジェニックマウスを利用した抗 NP モノクローナル抗体におけるインフルエンザウイルス感染防御能の解析、第 34 回九州実験動物研究会 2016

6. 研究組織

研究分担者等なし