

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08386

研究課題名(和文) 四量体分泌型IgA抗体形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a tetrameric secretory IgA antibody production

研究代表者

鈴木 忠樹 (Suzuki, Tadaki)

国立感染症研究所・感染病理部・部長

研究者番号：30527180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ等の呼吸器ウイルス感染症の予防に重要な分泌型IgA抗体の四量体化による抗ウイルス活性増強機構は今まで不明であった。本研究では、モノクローナル四量体分泌型IgA抗体作製技術を開発し、同一可変領域を有する様々な形状のIgA抗体の作製に成功した。本技術によりIgA抗体の四量体化は、抗ウイルス活性の最大活性を上げるのではなく、抗ウイルス活性の標的域の拡張に寄与していることを明らかにした。本研究成果により、モノクローナル四量体SIgA抗体作製技術を応用した新たな抗体医薬の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で我々が開発したモノクローナル四量体SIgA抗体作製技術は、抗ウイルス抗体の作用機構を解明する基礎研究のツールとしてだけでなく、粘膜組織に特化した新たな抗体医薬のプラットフォームとしての応用も可能と考えられる。現在、様々な分野で抗体医薬が重要視されているが、現在までに実用化されている抗体医薬は全てIgG型抗体医薬のみである。IgGとは異なる性質を有しているIgAを基本骨格とするIgA型抗体医薬の開発は抗体医薬の可能性をさらに大きく広げることが期待でき、本成果は基礎ウイルス研究に限らず今後の医薬品開発にとって重要な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of antiviral activity enhancement by tetramerization of secretory IgA antibody, which is important for the prevention of respiratory virus infections such as influenza, had been unknown. In this study, we developed a monoclonal tetrameric secretory IgA antibody production technique and succeeded in producing various forms of IgA antibody having the identical variable region. This technique revealed that the tetramerization of IgA antibody improved target breadth, but not peak potency of antiviral activities. The results of this research are expected to lead to the development of novel monoclonal antibody therapeutics using the monoclonal tetrameric secretory IgA antibody production technology.

研究分野：ウイルス学、ワクチン学

キーワード：IgA抗体 抗ウイルス活性 四量体分泌型IgA抗体 インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

生体内において最も産生量の多い抗体である IgA 抗体はインフルエンザ等の粘膜組織を標的とした感染症に対する生体防御の最前線防御因子として機能している。インフルエンザウイルスは呼吸器の粘膜上皮細胞に感染することにより病気を引き起こすが、粘膜組織にウイルス特異的な分泌型 IgA (SIgA) 抗体が存在すると効率良く感染を抑制できる事が知られており、SIgA 抗体の誘導を目指した経鼻粘膜投与型ワクチンの開発が進んでいる。応募者らは、不活化抗原を用いた安全な経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発研究を行っており、ヒトにおいて経鼻不活化インフルエンザワクチン接種後に鼻腔粘膜上にウイルスを中和できる SIgA 抗体が誘導されることを明らかにしている (Ainai A, et al., J Med Virol 2012; Ainai A, et al., Hum Vaccin Immunother 2013)。

ヒトでは、血清中の IgA 抗体はほぼ全てが単量体で存在するが、SIgA 抗体は多量体を形成しており、多くの SIgA 抗体は二量体として存在することが良く知られている。また、SIgA 抗体が見つかった当初から二量体よりも大きな SIgA 抗体の存在が指摘されており、40 年以上前に主に四量体として存在することが超遠心分析法により明らかにされている。しかしながら、生体内に存在する四量体 SIgA 抗体の量は限られておりヒト検体を用いた研究は進まず、その生理的意義や高次構造など、抗体分子に関する基本的な課題すら未解明のままであったが、我々の最近の研究により、経鼻インフルエンザワクチンを接種されたヒト呼吸器粘膜上には、ウイルス特異的な単量体、二量体、三量体、四量体および四量体以上の多量体 SIgA 抗体が誘導されており、三量体、四量体および四量体以上の多量体抗体は、単量体や二量体抗体に比べインフルエンザウイルス中和活性が高い(高機能である)が明らかになってきた(Suzuki T, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2015)。このことは、IgA 抗体は、IgG 抗体や IgM 抗体など生体内で単一の分子構造をとる抗体と異なり、重合状態を変化させる事により、自在に機能を変化させている事を示唆している。また、我々は、経鼻インフルエンザワクチンを接種されたヒトの呼吸器粘膜上から精製した四量体 SIgA を高速原子間力顕微鏡 (AFM) で観察することにより、二量体よりも大きい多量体 SIgA の形状を世界で初めて明らかにした。高速 AFM で観察された四量体 SIgA 抗体は「四つ葉のクローバー」のような形状をしており、分子中心部から放射状に伸びる「8本の腕」を大きく上下運動させていた。さらに、多量体 SIgA 抗体の Fab と考えられる分子外周の「腕」によりインフルエンザウイルスの糖タンパク質である HA 抗原がトラップされていく様子をリアルタイム観察することにも成功した。一般的に、多量体抗体は単量体に比べ抗原認識部位が多いことにより結合力が高くなり、中和活性などの機能が高くなると予想されているが、この AFM の観察結果は、1つの四量体 SIgA 抗体上に存在する複数の抗原認識部位が協調して効率良く抗原を捉えるという現象を直接的に可視化しており、前述の多量体抗体の高機能化機構の仮説を支持していた。

以上のような経鼻ワクチン接種者から採取した鼻腔洗浄液中に存在する SIgA 抗体を用いた解析により、血清中には存在しない高い抗ウイルス活性を持つ多量体 SIgA 抗体が経鼻ワクチンの有効性発現機構において重要であることが分かってきた。しかし、これらの多量体 SIgA 抗体の抗ウイルス活性が高くなる(高機能化する)機構については、不明である。HS-AFM の観察結果からは抗原認識部位が増加したことによる結合力の亢進が多量体化の効果の中心を担うことが示唆されたが、抗体の結合力と抗ウイルス活性に対する多量体化の効果を定量的に評価し、多量体化が IgA 抗体の機能亢進をもたらす分子機構を明らかにするためには、鼻腔洗浄液中のポリクローナルな状態の抗体の解析のみでは限界がある。このよ

うな解析のためには、様々なアイソタイプ、四次構造の抗体をモノクローナル抗体として作製し、その機能を比較解析する必要があるが、二量体よりも大きな多量体型のモノクローナル IgA 抗体を作製する手法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、四量体 SIgA 抗体形成機構を解析することにより、モノクローナル四量体 SIgA 抗体の作製方法を確立し、四量体化による抗体の抗ウイルス活性高機能化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

任意の抗原認識部位をコードする種々の鎖および軽鎖、J鎖(JC)、分泌片(SC)を哺乳類培養細胞に共導入し、培養上清中に分泌される抗体の性状解析を実施した。その結果、四量体化した SIgA 組換え抗体を自在に作製する技術を開発した(図、多量体 IgA 型遺伝子組換え抗体を含む組成物及びその利用、特許第 6564777 号)。この技術により、同一の抗原認識部位を有する IgG 抗体、単量体 IgA 抗体、二量体 IgA 抗体、四量体 IgA 抗体の抗ウイルス活性を比較検討し、抗ウイルス活性に与える多量体 IgA 化の効果を定量的に評価することが可能となった。

抗ウイルス活性に与える多量体 IgA 化の効果は抗原認識部位に依存して変化する可能性が考えられることから、鼻腔洗浄液由来のポリクローナルな状態の抗体で観察された現象の解明のためには、鼻腔粘膜中の IgA 抗体の中で抗ウイルス活性の中心的役割を担っている抗体クローンをを用いた評価が必要となる。抗インフルエンザウイルス活性を持つ抗体の中では、HA 抗原に結合し抗 HI 活性を持つ抗体がインフルエンザの発症抑制に相關することが古くから知られており、血清 HI 抗体価はワクチン有効性の代替指標(サロゲートマーカー)としても重要視されている。こ

れまでの解析により鼻腔洗浄液においても中和抗体価と HI 抗体価は正の相関性を示しており、HI 活性を持つ抗体は鼻腔粘膜中に存在する IgA 抗体の中でも抗ウイルス活性の主要な役割を担っていると考えられた。そこで、H3 垂型の様々なウイルス株の HA 抗原のレセプター認識部位を広く認識し中和活性と HI 活性を有する広域中和抗体として報告されていた抗体クローン F045-092 由来の抗原認識部位を持つ IgG 抗体、単量体 IgA 抗体、二量体 IgA 抗体、四量体 IgA 抗体を作製し、その抗ウイルス活性を比較検討した。

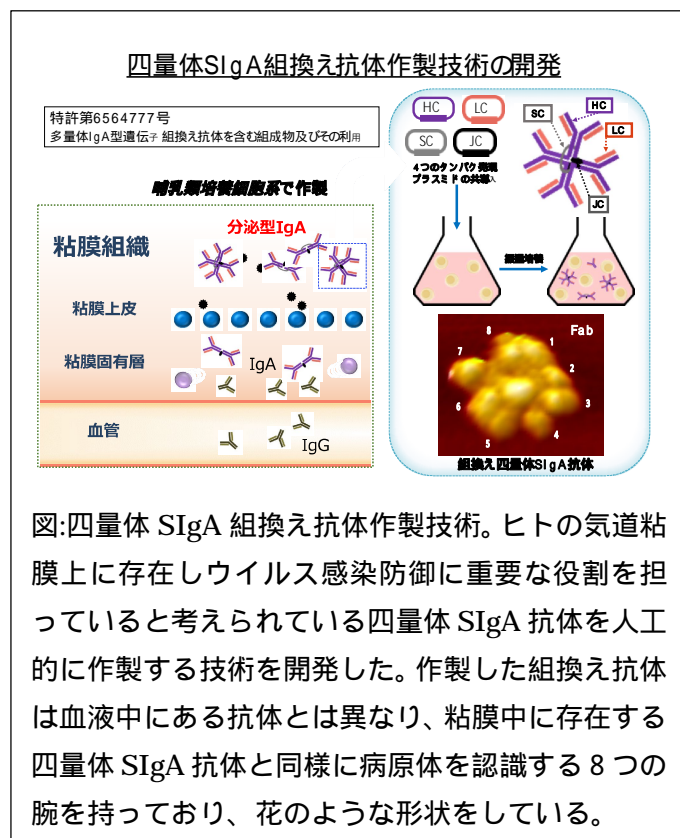


図:四量体 SIgA 組換え抗体作製技術。ヒトの気道粘膜上に存在しウイルス感染防御に重要な役割を担っていると考えられている四量体 SIgA 抗体を人工的に作製する技術を開発した。作製した組換え抗体は血液中にある抗体とは異なり、粘膜中に存在する四量体 SIgA 抗体と同様に病原体を認識する 8 つの腕を持っており、花のような形状をしている。

4. 研究成果

四量体化した IgA 抗体では、抗ウイルス活性の標的域が拡大しており、IgG 抗体や単量体 IgA 抗体の状態では十分に中和することができなかつた抗原性の異なるウイルス株に対しても、四量体 SIgA 抗体の状態では高い抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。一方で、IgG 抗体の状態ですら十分に高い抗ウイルス活性を示すウイルス株に対しては、四量体化による抗ウイルス活性のそれ以上の増強は認められなかつた。このことは、パラトープとエピトープの間の相互作用が十分に強い場合には、抗体の抗ウイルス活性は抗体の四次構造に依存しないことを意味しており、四量体化は抗原認識部位に依存的に決定される抗体クローン固有の抗ウイルス活性の最大活性は変化させることはできないと考えられた。すなわち、IgA 抗体の四量体化は、複数の抗原認識部位を使うことにより弱く不安定なパラトープ-エピトープ間相互作用を安定化させ、IgG 抗体の状態では中和活性に十分な結合性がなかつた抗原に対して中和活性の発揮に十分なレベルまで結合性を増強させ、交叉活性を向上させていると考えられた。これまでの鼻腔洗浄液を用いた研究において鼻腔粘膜の多量体 SIgA 抗体は交叉中和能が向上していることが明らかになっており、「1 種類の抗原認識部位を有する IgA 抗体が多量体化することにより抗原性の異なる多様なウイルスに対応できるようになるのだろう」と考えられていたが、この仮説の検証は十分ではなかつた。モノクローナル四量体 SIgA 抗体を用いた本研究により、IgA 抗体の四量体化は抗ウイルス活性の標的域を拡張しウイルス抗原変異に対する頑強性の向上に寄与していることが科学的に証明され、二量体以上の多量体 SIgA 抗体のインフルエンザウイルス感染防御における重要性が改めて強調された。この成果は、従来のインフルエンザワクチンにはない経鼻インフルエンザワクチンに特有のワクチン作用機序の一端を明らかにするものであり、経鼻ワクチン有効性の科学的根拠を示すことにより、現在進められている経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化を強力にバックアップするものである。さらに、本研究で開発した四量体 SIgA 組換え抗体作製技術は、ワクチンの有効性を解明する基礎研究のツールとしてだけでなく、粘膜組織に特化した新たな抗体医薬のプラットフォームとしての応用も可能と考えられている。現在、様々な分野で抗体医薬が重要視されているが、現在までに実用化されている抗体医薬は全て IgG 型抗体医薬である。IgG 抗体とは異なる性質を有している IgA 抗体を基本骨格とする IgA 型抗体医薬の開発は抗体医薬の可能性をさらに大きく広げることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ainai Akira, Riet Elly, Ito Ryo, Ikeda Kazuyuki, Senchi Kyosuke, Suzuki Tadaki, Tamura Shinichi, Asanuma Hideki, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Kurata Takeshi, Multihartina Pretty, Setiawaty Vivi, Pangesti Krisna Nur Andriana, Hasegawa Hideki	4. 巻 64
2. 論文標題 Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 313 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/1348-0421.12775	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 鈴木忠樹、長谷川秀樹	4. 巻 69
2. 論文標題 IgA抗体によるインフルエンザウイルス感染防御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Saito Shinji, Sano Kaori, Suzuki Tadaki, Ainai Akira, Taga Yuki, Ueno Tomonori, Tabata Koshiro, Saito Kumpei, Wada Yuji, Ohara Yuki, Takeyama Haruko, Odagiri Takato, Kageyama Tsutomu, Ogawa-Goto Kiyoko, Multihartina Pretty, Setiawaty Vivi, Pangesti Krisna Nur Andriana, Hasegawa Hideki	4. 巻 15
2. 論文標題 IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of anti-influenza virus broadly neutralizing antibody	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007427	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 Terauchi Yoshihiko, Sano Kaori, Ainai Akira, Saito Shinji, Taga Yuki, Ogawa-Goto Kiyoko, Tamura Shin-ichi, Odagiri Takato, Tashiro Masato, Fujieda Mikiya, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki	4. 巻 14
2. 論文標題 IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21645515.2018.1438791	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 -

1. 著者名 Sano Kaori, Ainai Akira, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki	4. 巻 17
2. 論文標題 Intranasal inactivated influenza vaccines for the prevention of seasonal influenza epidemics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Expert Review of Vaccines	6. 最初と最後の頁 687 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14760584.2018.1507743	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 -

1. 著者名 Ainai Akira, Suzuki Tadaki, Tamura Shin-ichi, Hasegawa Hideki	4. 巻 30
2. 論文標題 Intranasal Administration of Whole Inactivated Influenza Virus Vaccine as a Promising Influenza Vaccine Candidate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viral Immunology	6. 最初と最後の頁 451 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://doi.org/10.1089/vim.2017.0022	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 -

1. 著者名 Suzuki Tadaki, Ainai Akira, Hasegawa Hideki	4. 巻 35
2. 論文標題 Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5297 ~ 5302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.093	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 -

1. 著者名 Sano Kaori, Ainai Akira, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki	4. 巻 35
2. 論文標題 The road to a more effective influenza vaccine: Up to date studies and future prospects	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5388 ~ 5395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.034	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 -

1. 著者名 Takaki Hiromi, Takashima Ken, Oshiumi Hiroyuki, Ainai Akira, Suzuki Tadaki, Hasegawa Hideki, Matsumoto Misako, Seya Tsukasa	4. 巻 5
2. 論文標題 cGAMP Promotes Germinal Center Formation and Production of IgA in Nasal-Associated Lymphoid Tissue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 35 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/medsci5040035	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 Takaki H, Kure S, Oshiumi H, Sakoda Y, Suzuki T, Ainai A, Hasegawa H, Matsumoto M, Seya T	4. 巻 11
2. 論文標題 Toll-like receptor 3 in nasal CD103+ dendritic cells is involved in immunoglobulin A production	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/mi.2017.48	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐野 芳、黒澤 信幸、齊藤 慎二、相内 章、鈴木 忠樹、磯部 正治、長谷川 秀樹
2. 発表標題 経鼻接種型不活化ワクチンと皮下接種型不活化ワクチンにより誘導された 抗インフルエンザ抗体の質についての比較解析
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥谷 公亮、吉田 玲子、マンズール ラシッド、齊藤 慎二、鈴木 忠樹、市居 修、東 秀明、高田 礼人
2. 発表標題 A型インフルエンザウイルスに対する交差感染防御免疫への非中和IgA抗体の役割
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野 芳、齊藤 慎二、鈴木 忠樹、小谷 治、van Riet Elly、相内 章、田畑 耕史郎、高橋 宜聖、横山 勝、佐藤 裕徳、長谷川 秀樹
2. 発表標題 経鼻インフルエンザワクチンで誘導された抗HA stalk抗体のHAおよびNAの立体障害による抗ウイルス効果の発現
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑耕史郎、鈴木忠樹、佐野芳、齊藤慎二、相内章、大場靖子、長谷川秀樹、澤洋文
2. 発表標題 In vitroにおける四量体分泌型IgA抗体形成機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野芳、齊藤慎二、小谷治、相内章、Elly van Riet、田畑耕史郎、高橋宜聖、横山勝、佐藤裕徳、鈴木忠樹、長谷川秀樹
2. 発表標題 経鼻ワクチンにより誘導された抗インフルエンザHAステム抗体のウイルス感染防御機構
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, van Riet E, Ainai A, Tabata K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, Ogawa-Goto K, Hasegawa H
2. 発表標題 Extending an Anti-Viral Function of an Intranasal Vaccine-Derived Anti-Influenza Virus Hemagglutinin Stalk Antibody by IgA Polymerization
3. 学会等名 The 10th Global Virus Network Meeting: Eradication and Control of (Re-)Emerging Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Sano, Shinji Saito, Akira Ainai, Koshiro Tabata, Tadaki Suzuki, and Hideki Hasegawa
2. 発表標題 Enhancement and Extension in Anti-viral Functions of Influenza Virus Broadly Neutralizing Antibodies by IgA Multimerization
3. 学会等名 Keystone Symposia ~Molecular Approaches to Vaccines and Immune Monitoring~ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Sano, Tadaki Suzuki, Shinji Saito, Akira Ainai, Koshiro Tabata, and Hideki Hasegawa
2. 発表標題 Improvement in Functionality of Anti-Influenza Virus Antibodies Conferred by IgA Tetramerization
3. 学会等名 Influenza and Other Infections
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田畑耕史郎、鈴木忠樹、佐野芳、齋藤慎二、藤井信、齋藤訓平、原田陽介、相内章、長谷川秀樹
2. 発表標題 Secretory componentによる分泌型四量体IgA抗体形成促進の分子機構解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野芳、齋藤慎二、鈴木忠樹、相内章、小谷治、Elly van Riet、田畑耕史郎、藤井信、高橋宜聖、後藤希代子、影山努、長谷川秀樹
2. 発表標題 経鼻インフルエンザワクチンで誘導された広域中和抗体の多量体化による活性増強
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木忠樹、寺内芳彦、相内章、齊藤慎二、多賀祐喜、大原有樹、山口喜之、小田切孝人、田代真人、後藤希代子、長谷川秀樹
2. 発表標題 経鼻不活化インフルエンザワクチン接種により誘導される粘膜抗体の性状解析
3. 学会等名 第21回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐野芳、齊藤慎二、鈴木忠樹、上野智規、多賀祐喜、Elly van Riet、相内章、田畑耕史郎、藤井信、高橋宜聖、後藤希代子、長谷川秀樹
2. 発表標題 モノクローナル多量体IgA抗体作製法を用いた分泌型IgA抗体の抗ウイルス活性の解析
3. 学会等名 第21回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	田畑 耕史郎 (Tabata Koshiro)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・大学院生	