

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06401

研究課題名(和文) 様々なアレナウイルスを中和する高親和性抗体の作出

研究課題名(英文) Development of broadly neutralizing antibodies against mammarenaviruses

研究代表者

村本 裕紀子 (MURAMOTO, Yukiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70436567

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)：アレナウイルス科にはヒトに重篤な出血熱を引き起こすウイルスが多く存在する。そこで、抗体医薬品として利用可能な、全てのアレナウイルスを中和する広域な反応性かつ高親和性を示すモノクローナル抗体を作出することを目的として研究を進めた。その結果、数種類のアレナウイルス表面糖蛋白質を認識する、広域親和性を示すモノクローナル抗体を複数作出できた。現在、これらのモノクローナル抗体の中和活性等の性状解析を進めている。本研究で確立した一連の抗体作出方法が、抗アレナウイルス抗体を作出する方法として非常に有用であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した、副作用の少ない効果的な治療法として、がん、免疫炎症性疾患、感染症、その他の分野で利用されている。しかし、アレナウイルス感染症の治療法としては未だ実用化されていない。本研究では、複数のアレナウイルス種の表面糖蛋白質を認識するモノクローナル抗体を作出した。広域抗アレナウイルス抗体の作出に適した方法を見出すことができたと言える。

研究成果の概要(英文)：Several mammarenaviruses such as Lassa, Junin, Machupo, and Sabia viruses cause hemorrhagic fever in humans. Currently, there are no efficient treatments against mammarenavirus diseases. The goal of the study is to develop neutralizing antibodies that can be available for the treatment of several mammarenavirus infections. To this end, various immunization methods and screening methods for antibody-producing hybridomas were performed. Finally, we obtained several monoclonal antibodies which recognize glycoproteins of several mammarenaviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アレナウイルス

1. 研究開始当初の背景

アレナウイルスとはアレナウイルス科に属するウイルスの総称で、なかでも哺乳類を宿主とするアレナウイルスはマンマアレナウイルス属に属する。その自然宿主は主に齧歯類であるが、その尿や体液に含まれるウイルスが経気道経路でヒトに感染する人獣共通感染症病原体である。マンマアレナウイルスは抗原性の違いなどから、南北アメリカ大陸で流行する新世界アレナウイルスと、アフリカ大陸で流行する旧世界アレナウイルスに分類される (図1)。ヒトに対してほとんど病原性を示さないリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) なども含まれるが、ヒトに重篤な出血熱を引き起こすウイルスが多く存在する。ラッサウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルスなど、図1で赤字で示したウイルスは、ヒトに致死率の高い出血熱を引き起こす、バイオセーフティレベル (BSL) -4 に分類されるウイルスである。中でもラッサ熱を引き起こすラッサウイルスは、西アフリカを中心に毎年 30 万人程度が感染し、そのうち 5 千人から 1 万人が死亡しており、その被害が大きい。また、輸入感染例も世界各地でたびたび報告されており、日本でも 1987 年にアフリカからの帰国者がラッサ熱を発症している。しかし、今のところ、これらアレナウイルスに対する特異的な抗ウイルス薬がないことから、早急に抗アレナウイルス薬を開発する必要がある。さらに加えて、2003 年に南米で発生した出血熱アウトブレイクから、また、2008 年にアフリカ南部で発生した出血熱アウトブレイクから、それぞれ新規のアレナウイルスであるチャパレウイルス、ルジョウイルスが発見されている。つまり、今後もどのような新規アレナウイルスが出現するかわからない。したがって、様々なアレナウイルスに対して広域に効果のある抗ウイルス薬の開発が急務である。



図1. マンマアレナウイルス

抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した、副作用の少ない、効果的な治療薬として様々な病気に対して利用されている。アレナウイルスの主要抗原はウイルス表面に存在する 1 種類の糖蛋白質 glycoprotein complex (GPC) である。近年、ヒトから分離された抗ラッサウイルス GPC モノクローナル中和抗体が、ラッサウイルス感染マカクザルに投与されたところ、治療効果が認められた (Mire et al. Nat Med. 2017)。つまり、抗 GPC モノクローナル中和抗体がアレナウイルスに対する抗体治療薬になりうることを示された。一方で、フニンウイルスに感染したヒトから分離されたモノクローナル抗体がマチュポウイルスの GPC も中和したと報告されたり (Clark et al. Nat Commun. 2018)、マウスに様々なアレナウイルス GPC を免疫して細胞融合法を行った結果、全てではないが 8 種類のアレナウイルス GPC を認識する広域反応性モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 1 クローン作出できたとの報告があった (Amanat et al. mSphere, 2018)。残念ながら、後者のモノクローナル抗体には中和活性やマウス治療効果はなかったが、これらの報告により、様々なアレナウイルス GPC を中和するモノクローナル抗体の作出、つまり、様々なアレナウイルスに対して広域に治療効果のある抗体医薬品の開発が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マウスにさまざまな方法で免疫を行い、マウスリンパ球を用いてモノクローナル抗体を作出することにより、「抗体医薬品として利用可能な、全てのアレナウイルス GPC を中和する広域な反応性かつ高親和性を示すモノクローナル抗体」を多数作出することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、アレナウイルス中和抗体作出のための免疫源として、ラッサウイルス GPC を使用した。粗精製ラッサウイルス様粒子 (VLP)、ラッサウイルス GPC 発現細胞および精製リコンビナント GPC 蛋白質などを抗原として準備した。マウスを免疫した後、免疫マウスから血清を採取し、血清中の抗体価を免疫抗原を使用した ELISA 法により調べ、マウスの免疫状態を確認した。そのマウスの脾臓からリンパ球を採取し、リンパ球とミエローマ細胞のフュージョンを

行った。得られたハイブリドーマの培養上清に目的の抗体が含まれているかどうかを免疫抗原に対する ELISA や GPC 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法などの手法によりスクリーニングした。その後、選別した抗ラッサウイルス GPC 抗体産生ハイブリドーマをクローニングし、抗ラッサウイルス GPC モノクローナル抗体を得た。抗 GPC モノクローナル抗体が認識するアレナウイルス種を同定するために、様々なアレナウイルス由来の GPC 発現細胞を用いた間接蛍光抗体法を行った。さらにラッサウイルス GPC または他のアレナウイルス GPC を外套した VSV シュードタイプウイルスを使用し、作出した抗 GPC モノクローナルに中和活性があるか否かを調べた。以上により作出したモノクローナル抗体の性状解析を行った。

4. 研究成果

まず、ラッサウイルス GPC およびマトリックス蛋白質 Z を哺乳類細胞に共発現させて非感染性ウイルス様粒子 (VLP) を合成し、ショ糖密度勾配遠心法により粗精製したものを抗原としてマウスに免疫した。マウスに抗原に対する抗体価の上昇が認められたため、脾細胞を採取し、ミエローマ細胞とフュージョンさせて多数のモノクローナル抗体を得た。それぞれの抗体は粗精製 VLP を抗原とした ELISA では陽性だったが、ラッサウイルス GPC をプラスミドトランスフェクションにより発現させた細胞に対する間接蛍光抗体法を行ったところ、抗体のほとんどが、ラッサウイルス GPC に対する抗体ではなく、細胞成分を認識する抗体であることが判明した。免疫源を変更する必要があると考えられた。そこで別ウイルスのマトリックス蛋白質とラッサウイルス GPC を共発現させて VLP を作出し、マウスに免疫してフュージョンを行い、同様に抗体を作出したが、この場合も細胞成分を認識する抗体の割合が多かった。そのため、次に、ラッサウイルス GPC をプラスミドトランスフェクションにより発現させた哺乳類細胞をマウスに免疫し、同様にフュージョンを行い、多数のモノクローナル抗体を得た。粗精製 VLP を免疫源とした場合よりも GPC に対するモノクローナル抗体を多く作出できたが、細胞性因子に対する抗体も依然として多かった。

そこで、含まれる細胞成分が少ない免疫源を準備するために、ラッサウイルス GPC の細胞外領域に三量体化ドメインを付加させた分泌型 GPC を作出した。付加されたタグを用いて精製し、SDS-PAGE により混入物が非常に少ないことを確認した。分泌型 GPC をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作出したところ、ラッサウイルス GPC の立体構造を認識する抗体を非常に効率よく作出することができた。次に、ラッサウイルス GPC を外套した VSV シュードタイプウイルスを用いて、抗体が細胞への感染を抑えるかどうかを確認したところ、効率よくシュードタイプウイルスの感染を抑える抗体を見出すことはできなかった。そこでさらに、マウスの免疫方法を変更し、モノクローナル抗体を作出したところ、より効率よくラッサウイルス GPC 抗体を作出できた。現在、これらのモノクローナル抗体の性状解析を進めている。

これまでに作出した抗ラッサウイルス GPC 抗体が他のアレナウイルス GPC の立体構造を認識するかどうかを、様々なアレナウイルス GPC を発現させた細胞を用いて蛍光抗体法により調べたところ、複数のモノクローナル抗体がラッサウイルス以外の 2-5 種類のアレナウイルス GPC を認識した。抗体によって、認識するアレナウイルス種は異なった。現在、得られたモノクローナル抗体の中和活性等の性状解析を進めている。以上により、本研究で確立した一連の抗体作出方法が、抗アレナウイルス抗体を作出する方法として非常に有用であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takamatsu Y, Kajikawa J, Muramoto Y, Nakano M, Noda T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Microtubule-dependent transport of arenavirus matrix protein demonstrated using live-cell imaging microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy (Oxf)	6. 最初と最後の頁 450-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz034	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 Takenaga Toru, Zhang Zihan, Muramoto Yukiko, Fehling Sarah Katharina, Hirabayashi Ai, Takamatsu Yuki, Kajikawa Junichi, Miyamoto Sho, Nakano Masahiro, Urata Shuzo, Groseth Allison, Strecker Thomas, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 CP100356 Hydrochloride, a P-Glycoprotein Inhibitor, Inhibits Lassa Virus Entry: Implication of a Candidate Pan-Mammarenavirus Entry Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13091763	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 Kaku Y, Kuwata T, Zahid HM, Hashiguchi T, Noda T, Kuramoto N, Biswas S, Matsumoto K, Shimizu M, Kawanami Y, Shimura K, Onishi C, Muramoto Y, Suzuki T, Sasaki J, Nagasaki Y, Minami R, Motozono C, Toyoda M, Takahashi H, Kishi H, Fujii K, Tatsuke T, Ikeda T, Maeda Y, Ueno T, Koyanagi Y, Iwagoe H, Matsushita S.	4. 巻 36
2. 論文標題 Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109385 ~ 109385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109385	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 -

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------