

機関番号：34417

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780280

研究課題名 (和文) 組換え H 鎖抗体によるインフルエンザウイルス HA 開裂阻止と
感染防御効果の解析研究課題名 (英文) Obstruction of HA antigen cleavage of influenza virus with
recombinant H chain antibody and its antiviral effects

研究代表者

李 成一 (LEE SUNG-IL)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90361964

研究成果の概要 (和文)：

ラクダ科動物の H 鎖抗体の特徴を生かし、インフルエンザウイルス HA 蛋白の開裂を特異的に防ぐことで、ウイルス感染症の治療研究を意図した。血清での HI 試験では、熱処理によるタンパク変性により抗原認識能が顕著に低下するが、免疫後期においては僅かながら熱耐性の抗体分子が産生されていた。精製した H 鎖抗体の IgG 2 と IgG 3 は、熱処理後でも 1,440nmol、1,400nmol の濃度で HI (+) であった。VHH 抗体遺伝子特異的 PCR 産物をファージミドベクターに導入し、大腸菌 DH5 α に形質転換したクローンを分離した。より強いアフィニティーを持つ VHH クローンを単離するため、人為的な変異導入や DNaseI 処理による遺伝子の再構築の可能性についても検討する必要がある。

研究成果の概要 (英文)：

It is a research that develops H chain antibody of the camel family animal, reported to have an excellent antigen specificity and compatibility, to control influenza virus HA protein effectively, and that provide the treatment model of the virus disease. The H chain antibodies were separated from the llama immunized with HA antigen, and were reactive to the HA antigen after the treat for 30 minutes at 90°C. The amplified VHH antibody gene PCR products were introduced into phagemid vectors and separated from transformed DH5 α . It is necessary to examine the utility of the gene restructuring, by an artificial mutation introduction or the DNaseI processing, to isolate the VHH clone with a stronger affinity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：インフルエンザウイルス、H 鎖抗体

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザ感染症は、ヒトを含む

哺乳動物や鳥類に広く分布し、最も厄介な人
獣共通感染症である。特に、近年のアジアに

おける鳥インフルエンザ (H5N1) は抗インフルエンザ薬 (アマンダジン、リマンタジン) 耐性であったように、抗ウイルス薬についてはその副作用や耐性ウイルスの出現などの問題が報告されている (感染症学雑誌 80:1-7 (2006))。感染細胞から出芽したばかりのウイルスは膜融合活性を持たないため、まったく感染性を示さない。宿主の蛋白分解酵素 (プロテアーゼ) により HA 蛋白の特定部位が HA1 と HA2 に開裂されると膜融合活性を獲得し、ウイルス遺伝子を細胞質に放出することで、始めて感染が多段階に進行する。しかし、プロテアーゼ阻害による治療は、生体防御、代謝調節など生命維持に不可欠な働きまで抑制する恐れがある。従って、HA 蛋白の開裂を特異的に防ぐことにより、感染性を欠如したウイルスのまま、感染の広がりを抑制したほうがより効果的であると考えられる。

一方、治療用抗体の実用化が進展し、「個の医療」の実現を担う分野として注目されている。しかし、抗体療法の適応疾患は限られており、また HAMA 抗体 (Human anti-mouse antibody) の出現、到達性、長い半減期、特異性などが問題となる。このような背景から、通常の IgG 抗体 (H 鎖及び L 鎖) より優れている抗原特異性、親和性を持つラクダ科動物の H 鎖のみで構成される VHH 抗体分子の特徴 (低分子・抗原特異性・耐熱性など, *Nature* 363:446-448 (1993)) を生かした、ウイルス感染症の治療研究を意図した。また、有用性が確認された H 鎖抗体の抗原認識部位のペプチド化により、「ナノ抗体」よりもさらに低分子の治療薬が開発可能となる。

低分子と抗原特異性に優れているラマ H 鎖抗体による HA 蛋白開裂部位への結合と阻害は、子孫ウイルスの感染力獲得を妨げることでウイルスの感染拡大を抑制できると考えられる。免疫応答を誘導する抗原決定部位 (エピトープ) やレセプター結合部位およびプロテアーゼ開裂部位、全てが同じ HA 蛋白の上に存在し、感染機構も同じであることから、亜型に関わらず HA 開裂阻止を通じて、HA 抗原を標的とする抗体療法は、感染拡大の防止に効果的であると期待している。また、HA 抗原に対するプロテアーゼの生体内分布で病原性が決定 (強毒株の全身感染; furin, PC6 等、弱毒株の局所感染; トリプシン等) されるため、ウイルス感染そのものを防ぐことは困難であるが、プロテアーゼの分布に関係なく、ウイルス自体の HA 抗原開裂を防ぐことで感染の広がりを阻害することができる。HA 抗原開裂部位に特異的で、また構造的に遺伝子改変が容易なラマの H 鎖抗体を作製

し、ウイルス感染細胞から正常細胞への感染力獲得を阻害することで、ウイルス感染症の治療に応用できる。

2. 研究の目的

A 型インフルエンザウイルス HA 抗原を実験的にラマに免疫し、HA 抗原を特異的に認識するラクダ科動物の H 鎖抗体の遺伝子群を、*in vitro* 免疫系を再現できるファージディスプレイ法により選別し、遺伝子組換え抗体を作成する。また、その複数の抗体を基に遺伝子交雑や変異の導入によって HA 抗原の開裂部位に特異的な組換え H 鎖抗体を再度選別し、その HA 開裂阻止、感染防御及び治療効果を *in vitro* 及び *in vivo* にて解析する。さらに、選別された抗体の抗原結合部位を人工ペプチド化し、その有用性を赤血球凝集阻害試験 (HI 試験) によって検討する。

3. 研究の方法

(1) 対インフルエンザウイルス抗体の有用性および耐熱性評価

インフルエンザ HA 抗原 (A/Beijing/262/95 株) を 1 週間隔で 3 回接種し、免疫応答を十分高めたラマから血液を採取し、血清を分離した。経時的に採取した血清を HI 試験により H 鎖抗体の有用性について評価した。また、通常の IgG 1 および H 鎖抗体の IgG 2 と IgG 3 を、プロテイン A およびプロテイン G を用いて精製し、90°C で 30 分の処理により H 鎖抗体の耐熱性について同じく HI 試験により評価した。

(2) 対ラマ H 鎖抗体マウス抗体産生ハイブリドーマの作製

上記の免疫接種したラマの H 鎖抗体をそれぞれ Balb/c マウスに免疫後、脾臓からモノクローナル抗体を産生する B 細胞を採取した。ミエローマ細胞との融合によりハイブリドーマを作製し、その培養上清またはマウスの腹水を採取し、western blot 法により H 鎖抗体への反応性を確認した。また、ウシ血清を対照とし、交差反応について同じく western blot 法により確認した。

(3) VHH 抗体遺伝子ファージミドの作製

3 回目免疫の 1 週間後、抗凝固剤を処理した血液を採取し、リンパ球を分離した。リンパ球から市販のキットを用いて、cDNA を調製した。VHH 抗体遺伝子特異的 Lam07, Lam08, VH-backA6 primers を用いた PCR により H 鎖抗体遺伝子を増幅させ、その遺伝子断片を pCANTAB5E ファージミドベクターに導入した。大腸菌 TG1 への形質転換および M13K07 ファージによる抗体分子提示を行い、ファージラ

イブラリを作製した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス HA 抗原に対する H 鎖抗体の耐熱性

インフルエンザ HA 抗原 (A/Beijing/262/95 株) を 1 週間隔で 3 回混合接種し、免疫応答を十分高めたラマの血液を採取し、血清および末梢リンパ球を分離した。免疫前、1 回、2 回および 3 回目免疫後の血清を用いた HI 試験では、HI (-)、HI (+) 1:32、HI (+) 1:1,024、HI (+) 1:1,024 であり、2 回以上の免疫により十分な免疫応答が誘導されていた。また、90°C で 30 分間熱処理後の HI 試験では、それぞれ HI (-)、HI (-)、HI (-)、HI (+) 1:8 であり、熱処理によるタンパク変性により抗原認識能が顕著に低下することを示した。しかし、免疫後期においては僅かながら熱耐性の抗体分子が産生されていると示され、目的とする耐熱性の H 鎖抗体であると考えられた。通常の IgG 1 および H 鎖抗体の IgG 2 と IgG 3 を、プロテイン A およびプロテイン G を用いて精製し、HI 試験を行った結果、それぞれ 50nmol、360nmol、350nmol の濃度で HI (+) であった。熱処理後は、HI (-)、1,440nmol、1,400nmol であり、H 鎖抗体は 90°C 30 分処理でもタンパク変性しない抗体分子であることを確認した。

(2) 対ラマ H 鎖抗体ハイブリドーマの作製と反応性

上記の精製した H 鎖抗体の IgG 2 (約 85kDa) と IgG 3 (約 95 kDa) を、マウスに免疫した後、脾臓細胞を用いて細胞融合・ハイブリドーマを形成し、ラマの H 鎖抗体のみを特異的に認識する抗体の探索を試みた。H 鎖抗体に反応すると考えられる 20 クローンを選別したが、対照群で利用したウシ抗体や血清アルブミンへの交差反応も認められたため、ラマ H 鎖抗体特異的ハイブリドーマではなかった。ホール H 鎖抗体での免疫では、相同性が高い保存領域が多数存在するためと思われるため、抗体分子の相同性の比較評価およびペプチド抗原による免疫が効果的であると考えられる。

(3) H 鎖抗体遺伝子ファージクローンの作製

VHH 抗体遺伝子特異的 Lam07, Lam08, VH-backA6 primers を用いて 400bp 前後の PCR 産物が得られ、そのラマ H 鎖抗体遺伝子断片を pCANTAB5E ファージミドベクターに導入し、大腸菌 DH5 α に形質転換したクローンを、40 クローン (Lam07) 及び 10 クローン (Lam08) 分離した。また、大腸菌 TG1 への形質転換および M13K07 ファージを用いて抗

体分子を提示するファージの作製を行い、ライブラリを作製し、市販 HA 抗原を結合したプレートにおいてバイオパンニングを行い、強いアフィニティーを持つ VHH クローンの単離を試みている。一方、MnCl₂ 存在下で抗体分子に人為的に変異を導入した遺伝子産物や DNaseI を処理し遺伝子を再構築したものについても、同様のファージライブラリを作製し、インフルエンザウイルスの HA 抗原により特異的な遺伝子組換えラマ H 鎖抗体の作製を検討する必要があると考えられる。

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 7 件)

- (1) Sung-il Lee, Md. Ariful Islam, Mst. Minara Khatun, Gyu-Young Choi, Jae-Myeong Jung, Byeong-Kirl Baek and Ibulaimu Kakoma (2010): Immunoglobulin profiles in acute brucellosis experimentally induced by *Brucella canis* in BALB/c mice. Vector Borne Zoonotic Diseases, 10: 927-930. (査読あり)
- (2) Akihiko Watanabe, Satoshi Kakutani, Ryohei Ogawa, Sung-il Lee, Toru Yoshida, Akihiro Morii, Go Kagiya, Loreto B. Feril Jr., Hideki Fuse and Takashi Kondo (2009): Construction of artificial promoters sensitivity responsive to sonication in vitro. Journal of Medical Ultrasonics, 36: 9-17. (査読あり)
- (3) Ryohei Ogawa, Sung-il Lee, Hironori Izumi, Go Kagiya, Toru Yohsida, Akihiko Watanabe, Akihiro Morii, Satoshi Kakutani, Takashi Kondo, Loreto B. Feril Jr. and Tetsuya Ishimoto (2009): Enhancement of artificial promoter activity by ultrasound-induced oxidative stress. Ultrasonic Sonochemistry, 16: 379-386 (査読あり) .
- (4) Mst. Minara Khatun, Md. Ariful Islam, Byeong-kirl Baek and Sung-il Lee (2009): Cellular and humoral immune responses and antigen recognition in Sprague- Dawleyrats

experimentally infected with
Brucella abortus biotype 1. Asian
Journal of Animal and Veterinary
Advances, 4: 267-277. (査読あり)

- (5) Mst. Minara Khatun, Md. Ariful Islam,
Byeong-kirl Baek and Sung-il Lee
(2009): Characteristics of the immune
response during acute brucellosis in
Sprague-Dawley rats. Journal of
Infection in Developing Countries, 3:
392-397. (査読あり)
- (6) Md. Ariful Islam, Mst. Minara Khatun,
Byeong-kirl Baek and Sung-il Lee
(2009): Efficacy of strain RB51
vaccine in protecting infection and
vertical transmission against
Brucella abortus in Sprague-Dawley
rats. Journal of Veterinary Science,
10: 211-218. (査読あり)
- (7) Sung-il Lee, Min-jun Choi, Mst.
Minara Khatun, Md. Ariful Islam,
Byeong-kirl Baek, Chang-Seup Lee and
Ibulaimu Kakoma. (2009): Analysis of
human brucellosis sera using western
blot assay. Korean
Journal of Veterinary Public Health,
33:39-45. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 成一 (LEE SUNG-IL)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：9 0 3 6 1 9 6 4