

機関番号：13201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21790767

研究課題名 (和文) トリインフルエンザ制圧に向けたインフルエンザM2 特異的
ヒト抗体の単離と機能解析研究課題名 (英文) Isolation and characterization of a human monoclonal antibody against
M2 of influenza A virus for reduction of avian influenza

研究代表者

小澤 龍彦 (OZAWA TATSUHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号：10432105

研究成果の概要 (和文) : 我々はISAAC法を用い、インフルエンザワクチン接種ボランティアよりインフルエンザM2eと結合する抗体のスクリーニングを行った。その結果、M2eと結合するAb1-10を得た。その機能解析を行った結果、季節性ウイルスのみならず、トリ型や2009年のパンデミック型にも結合することが示された。さらに *in vitro* において抗ウイルス能が示された。これらの結果はAb1-10が有用な抗体医薬候補であることを示唆している。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we applied ISAAC method to detect influenza virus-specific B-cells in peripheral blood from healthy volunteers who had been immunized with influenza HA vaccine to generate human influenza monoclonal antibodies. We obtained many human monoclonal antibodies reacting influenza viruses, and characterized their functions. One of them (Ab1-10) specifically bound external domain of the matrix protein 2 (M2e). We demonstrate that Ab1-10 reacted not only to seasonal influenza A viruses, but also to pandemic (H1N1) 2009 virus (2009 H1N1) and highly pathogenic avian influenza A virus. More importantly, it inhibited 2009 H1N1 viral replication *in vitro*, suggesting that it could be a potent candidate for medical application.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：インフルエンザ、M2、抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスの膜貫通タンパクである M2 は、ウイルス感染細胞で豊富に発現している。HA 及び NA と異なり、M2 のエピトープとなる細胞外ドメイン (M2e) は H5N1 等のトリインフルエンザウイルスを含む全ての A 型インフルエンザウイルス間でよく保存されている (Virol J, 102:3, 2006, J Virol, 5491:65, 1991, Nat Med, 1157:5, 1999, Nucleic Acids Res, 2870:17, 1989)。このため抗 M2 抗体はインフルエンザ患者に対する抗体に基づく受動免疫療法を開発する際の標的だけでなく、トリインフルエンザに対する画期的な治療法となることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究課題はトリインフルエンザウイルスを制圧する画期的な抗体医薬開発の基礎研究を目的とした。即ち、トリインフルエンザウイルスを含む A 型インフルエンザウイルスに共通して発現し、かつ抗原性変異が少ない M2e に対するヒト抗体を作製する。さらにそれら抗 M2 ヒト抗体の機能解析を通して、*in vitro* における中和能の検討を行う。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントのもとインフルエンザ HA ワクチン接種ボランティアより末梢血を採取し、我々が独自に開発した ISAAC 法を用い、インフルエンザ特異的抗体産生細胞の検出を行った。その細胞を採取し、そこから抗体遺伝子の増幅を行いリコンビナント抗体を作製した。これら抗体の中から M2 特異的抗体のスクリーニングを行い、その機能解析を行った。

4. 研究成果

健康人ボランティアより 50 種類以上の抗インフルエンザウイルス抗体を得ることに成功した。この中から M2e 特異的抗体のスクリーニングを行った結果、Ab1-10 が M2e と結合する事が明らかとなった。

Ab1-10 が様々な A 型インフルエンザと結合する事を調べるため、A 型季節性の H1N1 (A/NewCaledonia/20/99)、同じく A 型季節性の H3N2 (A/Panama/2007/99)、B 型季節性ウイ

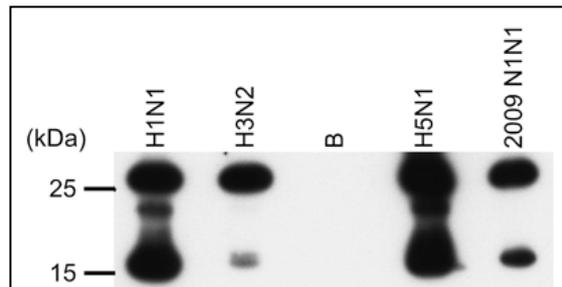


図 1. Ab1-10 を用いたウェスタン法による解析。A 型インフルエンザの 16kDa 及び 26kDa 付近に特異的バンドが検出された。

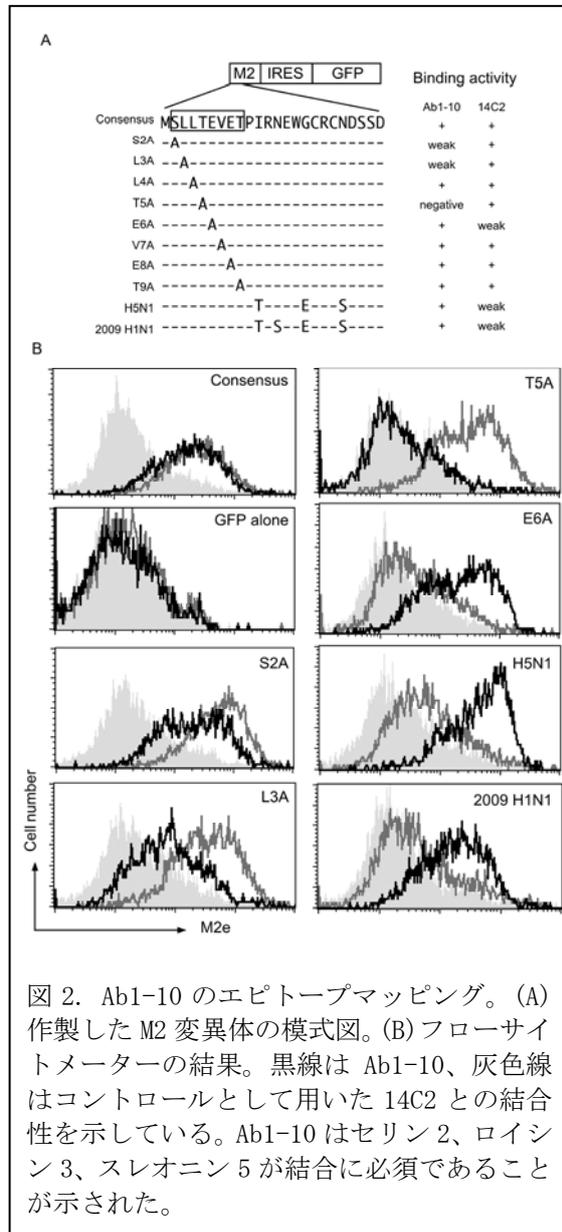
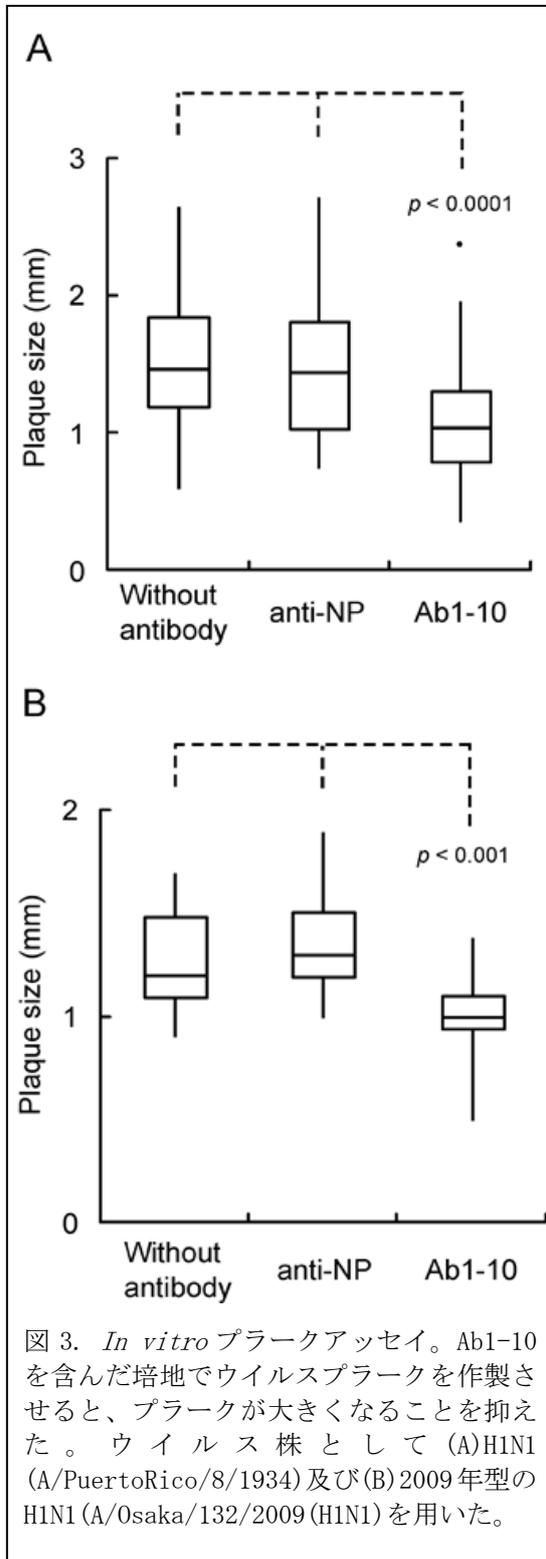


図 2. Ab1-10 のエピトープマッピング。(A) 作製した M2 変異体の模式図。(B) フローサイトメーターの結果。黒線は Ab1-10、灰色線はコントロールとして用いた 14C2 との結合性を示している。Ab1-10 はセリン 2、ロイシン 3、スレオニン 5 が結合に必須であることが示された。

ルス (B/Tokio/53/99)、A 型でいわゆるトリ型の H5N1 (A/Vietnam/1194/04)、A 型で 2009 年に流行した H1N1 (A/California/ 7/2009) の 5 種類の不活化ウイルス抗原と結合するかをウエスタン法により検討を行った。その結果、A 型のウイルス抗原と結合することが明らかになった(図 1)。



Ab1-10 のエピトープを決めるため、M2e の一部のアミノ酸配列を持ったペプチドを用いて ELISA による解析を行った。その結果、Ab1-10 は 2 から 9 番目のアミノ酸をエピトープとしていることが明らかになった。さらに Ab1-10 がどのアミノ酸を認識するかを調べるため、1 アミノ酸ずつアラニンに置換した M2e 変異体発現プラスミドを作製し、哺乳類細胞に発現させ、その結合性をフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、セリン 2、ロイシン 3、スレオニン 5 が結合に必須であることが示された(図 2)。

Ab1-10 が抗ウイルス能を持っているかを調べるため *in vitro* においてプラークアッセイを行った。その結果 H1N1 (A/PuertoRico/8/1934) 及び 2009 年型の H1N1 (A/Osaka/132/2009 (H1N1)) ウイルスのプラークが大きくなることを阻害することが示された(図 3)。

以上の結果より、本研究によって得られた抗 M2 ヒト抗体はパンデミックの危機に瀕しているトリインフルエンザウイルスのみならず、2009 年に流行したインフルエンザウイルスを制圧する画期的な抗体医薬開発の基礎研究となることが期待される。

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 5 件)

[1] Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Kishi H, Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nat Protoc* 2011. 6(5):668-76. (査読有)

[2] Tajiri K, Ozawa T, Jin A, Tokimitsu Y, Minemura M, Kishi H, Sugiyama T, Muraguchi A. Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Res* 2010. 87(1):40-9. (査読有)

[3] Lin Z, Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Ishida I, Jin F, Kishi H, Muraguchi A. Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010. 395(2):251-7. (査読有)

[4] Jin A*, Ozawa T*, Tajiri K*, Lin Z, Obata T, Ishida I, Kishi H, Muraguchi A. Generation of TRAIL-receptor 1-specific human monoclonal Ab by a combination of immunospot array assay on a chip and human Ab-producing mice. Eur J Immunol 2010. 40(12):3591-3593. * : equal contribution (査読有)

[5] Kinoshita K*, Ozawa T*, Tajiri K, Kadowaki S, Kishi H, Muraguchi A. Identification of antigen-specific B cells by concurrent monitoring of intracellular Ca²⁺ mobilization and antigen binding with microwell array chip system equipped with a CCD imager. Cytometry A 2009. 75(8):682-7. * : equal contribution (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

[1] Jin A, Kobayashi E, Ozawa T, Tajiri K, Kishi H, Muraguchi A. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-Receptor 1 specific human mAbs generated by Immunospot array assay on a chip. Keystone Symposia 2011. 2. 6-11:Keystone, USA.

[2] Muraguchi A, Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Takemoto M, Okuda T, Siraki K, Kishi H. Characterization of human anti-influenza M2 antibody obtained from peripheral blood of vaccinated volunteer. Keystone Symposia 2011. 2. 6-11:Keystone, USA.

[3] 小澤龍彦, 金艾順, 田尻和人, 武本眞清, 奥田智子, 白木公康, 岸裕幸, 村口篤. ヒトから単離したインフルエンザM2e特異的抗体の機能解析. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010. 12. 7-10:神戸.

[4] Fujimoto R, Ozawa T, Kuraishi Y, Itoyama T, Sadamori N, Isobe M. Helios gene involvement in t(2;14)(q34;32) in an adult T-cell leukemia (ATL) cells. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010. 12. 7-10:神戸.

[5] Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Takemoto M, Okuda T, Siraki K, Kishi H, Muraguchi A. Isolation and characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. Cold Spring Harbor

Conferences Asia 2010. 11. 7-10:Suzhou, China.

[6] Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Lin Z, Kishi H, Muraguchi A. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-receptor 1 specific human mAbs generated by immunospot array assay on a chip. Cold Spring Harbor Conferences Asia 2010. 11. 7-10:Suzhou, China.

[7] Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Siraki K, Kishi H, Muraguchi A. Characterization of human anti-influenza M2 antibody obtained from peripheral blood of vaccinated volunteer. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 23-27:Kobe.

[8] Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Ozawa T, Jin A, Kishi H, Sugiyama T, Muraguchi A. The novel method to detect single cytokine-secreting T-cell using a cell-microarray chip. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 23-27:Kobe.

[9] Kobayashi E, Hatakeyama S, Horii M, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. Single T cell analysis system for rapid cloning and functional evaluation of antigen-specific T cell receptors. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 23-27:Kobe.

[10] Kishi H, Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Lin Z, Obata T, Ishida I, Muraguchi A. Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-R1-specific human mAbs generated by immunospot array assay on a chip. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 23-27:Kobe.

[11] Kishi H, Tajiri K, Hatakeyama S, Kobayashi E, Horii M, Jin A, Ozawa T, Muraguchi A. Detection of antigen-specific T-cell response on the single cell-basis with microwell array chip. 4th Measuring Antigen-Specific Immune Response (MASIR) Conference 2010. 6. 9-12:Mykonos, Greece.

[12] Horii M, Kobayashi E, Hatakeyama S, Ozawa T, Tajiri K, Kishi H, Muraguchi A. Rapid and efficient cloning and functional evaluation system for antigen-specific T cell receptor obtained from single T-cells. 4th Measuring Antigen-Specific Immune

Response (MASIR) Conference
2010. 6. 9-12: Mykonos, Greece.

[13] Ozawa T, Jin A, Tajiri K, Obata T, Kondo S, Kinoshita K, Kadowaki S, Takahashi K, Sugiyama T, Kishi H, Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 9-12: 横浜.

[14] 藤本理加, 小澤龍彦, 黒澤信幸, 磯部正治. 成人T細胞白血病リンパ腫の発症には Helios 遺伝子の発現異常が関与する. 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 9-12: 横浜.

[15] Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Kishi H, Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. IBCOs 20th Annual International Conference Antibody Engineering 2009. 12. 6-10: San Diego, USA.

[16] Ozawa T, Tajiri K, Jin A, Kishi H, Muraguchi A. Isolation of human anti-influenza M2 antibody from peripheral blood of healthy volunteer. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 2-4: 大阪.

[17] 田尻和人, 小澤龍彦, 金艾順, 岸裕幸, 村口篤. HBワクチンにより得られたモノクローナル抗体のHBV中和活性とエピトープ解析. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 2-4: 大阪.

[18] Kishi H, Ozawa T, Tajiri K, Muraguchi A. 単一細胞レベルにおけるB細胞受容体シグナル解析. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 2-4: 大阪.

[19] Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Kishi H, Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009. 12. 2-4: 大阪.

[20] Tajiri K, Ozawa T, Jin A, Tokimitsu Y, Nakayama Y, Minemura M, Kishi H, Sugiyama T, Muraguchi A. Extracellular loop domain of small (S)-HBsAg play a major role in preventing the infection of HBV: the result from comprehensive analysis of monoclonal

antibodies obtained from S-HBsAg-vaccinated healthy individuals. The 8th JSH Single Topic Conference 2009. 11. 21-22: Tokyo.

[21] Kinoshita K, Kishi H, Fukurotani K, Honda R, Ozawa T, Tajiri K, Muraguchi A. B-cell receptor signal analysis at single cell levels using a microwell-array chip. Cold Spring Harbor Meeting 2009. 11. 11-14: New York, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 龍彦 (OZAWA TATSUHIKO)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教

研究者番号 : 10432105