

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659338

研究課題名(和文) ファージディスプレイ法による、交叉反応性ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離とその定性

研究課題名(英文) Isolation and characterization of cross-reactive human monoclonal antibodies against human noroviruses.

研究代表者

守口 匡子 (Moriguchi, Kyoko)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60298528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトノロウイルスのChiba407株(GI.4)、あるいは、Narita104株(GII.4)の人工ウイルス様空粒子(VLP)を抗原に用い、3つのヒト由来ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして、GI.4特異的、GII.4特異的、GI内交差反応性、GII内交差反応性、そして、GI-GII間交差反応性の抗体を、それぞれ3、39、1、2、1クローン単離した。これら抗体の、ウイルスレセプター候補分子である組織・血液型抗原(HBGA)へのVLP吸着阻害活性を調べた結果、GI.4特異的、GII.4特異的、GII内交差反応性、そして、GI-GII間交差反応性の抗体に、強い吸着阻害活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Three phage-displayed antibody libraries originating from healthy person(s) were screened using purified virus-like particles (VLPs) of strain Narita 104 (r104) or strain Chiba 407 (rCV,) as antigens. On screening with r104, 62 clones were isolated. Among these antibodies, 2 clones, 12A11 and 12B10, showed intra-genogroup cross-reactivity to genotypes 1, 3-7, 12, and 14, and genotypes 1, 4, 6, and 7 of genogroup II, respectively. On screening with rCV, 5 clones were isolated, 2 of which were cross-reactive. One, CV-2F5, reacted to genotypes 1-4, and 8 of genogroup I, and the other, CV-1A5, showed inter-genogroup cross-reactivity to all the VLPs employed in this study. The blocking activities of the monoclonal antibodies (mAbs) against the interaction of homotypic VLPs with histo-blood group antigens (HBGAs) were also assessed. 12B10 and CV-1A5 prevented the binding of the VLPs to HBGAs, suggesting that they are cross-reactive mAbs with neutralizing activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：抗ノロウイルス抗体 ヒト型ファージ抗体 組織・血液型抗原 交叉反応性

1. 研究開始当初の背景

感染性胃腸炎や食中毒の病原ウイルスであるヒトノロウイルス (HuNoV) は genogroup I と II に分類され、さらに genogroup I には 1-15 の、genogroup II には 1-18 の genotype が報告されており、多様性に富むウイルスである。その感染力は強く、乳幼児から成人まで幅広く感染し、大きな社会被害をもたらしている。しかし、HuNoV の感染・増殖が可能な培養細胞系は確立されておらず、基礎的研究はもとより、臨床応用に繋がるウイルス学的研究もほとんど進んでいない。我々は、多数の抗 HuNoV 抗体の単離とそれらが認識するエピトープの同定は、中和能を有する抗体の選別や、ウイルスワクチンの設計、更には、ウイルスレセプターや増殖機序の解明に寄与する所が大きいと考える。加えて、それらが人工抗体であれば、大量生産が容易で、血液製剤による感染性因子混入の危険性を回避できるため、安価なウイルス検出キット開発はもとより、受動免疫による治療や予防にも有用である。我々はこれまでに、冬季乳幼児下痢症の病原体であるヒトロタウイルスに対する交叉反応性中和抗体を、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数単離し、IgG 型の人工ヒト型中和抗体の作製や (K. Higo-Moriguchi et al, 2004, Journal of Virology)、ヒト抗体特異的中和エピトープの同定 (N. Monnier, K. Higo-Moriguchi et al, 2006, Journal of Virology) を行ってきた。そのノウハウを生かし、ウイルス性胃腸炎のもう一つの主要な原因ウイルスである、HuNoV に対する抗体を網羅的に単離・定性して、交叉反応性中和抗体の選別や、ウイルス感染・増殖機序解明を目指したいとの着想に至った。

2. 研究の目的

HuNoV 感染症に対し、ヒト型ファージ抗体を用いた受動免疫による治療や予防を可能にする、それら抗体を利用した、簡便で安価なウイルス検出キットを開発する、それら抗体が認識するエピトープを同定し、HuNoV ワクチンの設計を行う等、臨床応用に即した目的に加え、多数の抗体から得られる情報をもとに、HuNoV のウイルス学的基礎研究も行って、感染・増殖可能な培養細胞系を樹立することをも目指し、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから、交叉反応性や中和を含む抗 HuNoV 抗体を網羅的に単離し、それらを定性することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) genogroup I/genotype 4 (GI.4) タイプの Chiba407 (CV) 株、および、GII.4 タイプの Narita104 (104) 株のウイルス様空粒子 (VLP、それぞれ rCV と r104) を抗原に用い、

ヒトの末梢血より作成した A1944、NA1974、数十人の扁桃、脾臓、骨髄、臍帯血、末梢血等の B 細胞リッチな組織より作成した AIMS5 の、計 3 つのヒト由来抗体ライブラリーをスクリーニングする。

(2) rCV と r104 の他に、r124 (GI.1)、r258 (GI.2)、r645 (GI.3)、rW18 (GI.8)、r485 (GII.1)、r18-3 (GII.3)、r336 (GII.3)、r754 (GII.5)、r445 (GII.6)、r10-25 (GII.7)、r76 (GII.12)、r47 (GII.14) を抗原に用い、ELISA 法にて、単離された抗 HuNoV 抗体の交叉反応性を詳細に検討する。

(3) 単離された抗 HuNoV 抗体が認識する、ウイルス構造タンパク質上の抗原エピトープを、粒子形成タンパク質 VP1 をそのサブドメイン毎に大腸菌で発現させて精製し、それらを抗原として、ELISA 法にて同定する。

(4) 単離された抗体と HuNoV レセプターの候補分子である組織-血液型抗原 (HBGA) との吸着競合実験を行い、中和抗体の可能性を探る。

(5) 単離された抗 HuNoV 抗体が、実際に生体防御に関わっているかを、健康人血清サンプルとの結合阻害実験で検証する。具体的には、幅広い年齢層の健康人血清サンプルと rCV、あるいは、r104 を先に反応させ、その後、ファージ抗体が VLP に吸着するかどうかを ELISA 法にて検証する。

4. 研究成果

(1) rCV、あるいは、r104 を抗原として用い、3 つのヒト由来ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして、計 67 クローン・46 種類の抗 HuNoV 抗体を単離した。なお、別人より独立して作成した異なるライブラリー A1944 と NA1974 から、同じタイプの (H 鎖の 3 つの超可変領域のアミノ酸配列が全く同じ) 抗体が単離された。

(2) 多種多様な genogroup/genotype の VLP を抗原に用い、単離された抗 HuNoV 抗体の交叉反応性を調べたところ、12A11 が GII 内の、12B10 が GII.1,4,6,7,間の、CV-1A5 が GI-GII 間の、CV-2F5 が GI 内の、交叉反応性抗体であることが明らかとなった。それ以外の抗体は、それぞれの単離に用いた VLP (homotypic VLP) 特異的抗体であった (図 1)。

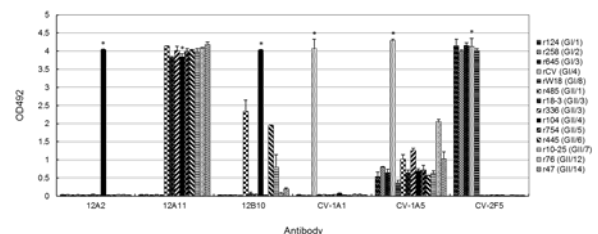


図 1

(3) CV 株、あるいは、104 株の VP1 タンパク質を、Nt、S、P1N、P1-P2、P1C のサブドメイン毎に、GST 融合タンパクとして発現させ

た場合、ELISA 法の抗原として適さない結果が得られた。そこで各サブドメインを SUMO 融合タンパクとして発現させることとし、現在、各融合タンパク質のコンストラクト作成を行い、レコンビナントタンパク質の発現の有無を検証している。

(4) CV 株は Le^a と Le^b 抗原に、104 株は H、A、B、Le^b 抗原に、それぞれ結合活性があることが報告されている (Shirato, H. et al. Journal of Virology, 82:10756-10767, 2008)。 (2) で記載した 4 つの交差反応性抗体に加え、homotypic VLP 特異的抗体である 12A1、あるいは、CV-1A1 についても、VLP の各種 HBGA への吸着阻害活性があるかを検討した結果、いずれの抗体にも、阻害活性が認められた。ただし、homotypic VLP 特異的抗体の方が吸着阻害活性が強く、交差反応性抗体はやや弱い傾向がみられた (図 2 と 3)。また、別人より独立して作成した異なるライブラリー A1944 と NA1974 から単離された、同一タイプの抗体 1A9 と 5A8 も、各種 HBGA への VLP 吸着阻害活性が高いことが示された (図 4)。以上の結果から、これらの抗体が中和抗体である可能性が示唆された。

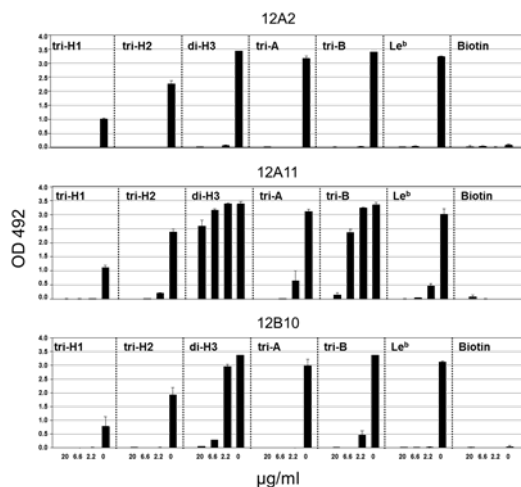


図 2

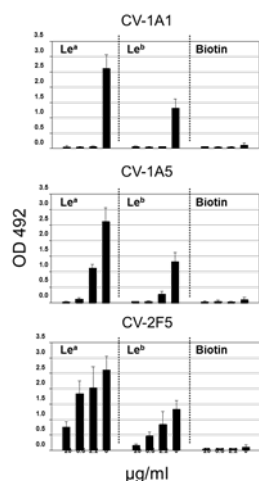


図 3

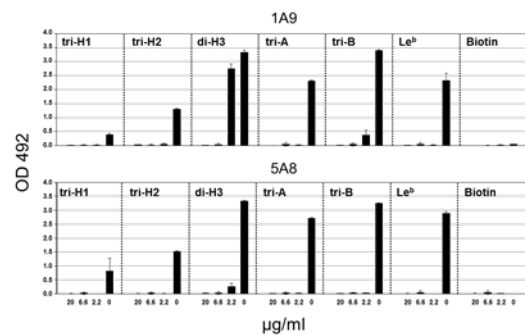


図 4

(5) (2) および (4) に記載した 6 つの抗体と同じエピトープを認識する抗体が、実際に健康人の生体内で誘導されているかを検証した結果、homotypic VLP 特異的抗体 1A9、5A8、12A2、CV-1A1 と同じタイプの抗体が、多くの健康人血清内に存在することを示唆する結果が得られた。それに比して、交差反応性抗体と同じエピトープを認識する抗体を含むことを示唆する血清は、やや少なかった。

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 2 件)

K. Higo-Moriguchi, H. Shirato, Y. Someya, Y. Kurosawa, N. Takeda, and K. Taniguchi. Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigen. Journal of Medical Virology, 査読有, 86, 2014, p558-567, DOI 10.1002/jmv.23734.

S. Rahman, K. Higo-Moriguchi et al (17 人中 2 番目). Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea. Vaccine, 査読有, 30, 2012, 4661-4669, DOI 10.1016/j.vaccine.2012.01091.

[学会発表](計 4 件)

Rahaman S, Higo-Moriguchi K, Htun K W, Taniguchi K, Icatlio FC, Tsuji T, Kodama Y, Nguyen SV, Umeda K, Oo HN, Myint YY, Htut T, Myint SS, Thura K, Thu HM, Fatmawati NND, Ogyma K. Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program; 2012, Japan (Sapporo).

守口匡子,白土東子,染谷雄一,武田直和,奥野良信,黒澤良和,谷口孝喜.ファージディスプレイ法により単離したヒト型抗ノロウイルス抗体の,ウイルス 血液型高原吸着阻害活性の検討.第60回日本ウイルス学会学術集会;大阪.2012.

守口匡子,白土東子,染谷雄一,武田直和,奥野良信,黒澤良和,谷口孝喜.ファージディスプレイ法により単離したヒト型抗ノロウイルス抗体の,ウイルス 血液型高原吸着阻害活性の検討.第60回日本ウイルス学会学術集会;大阪.2012.

Higo-Moriguchi K, Horikoshi-Shirato H, Someya Y, Okuno Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies against human norovirus. XV International Congress of Virology; Japan. 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

守口 匡子 (MORIGUCHI KYOKO)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60298528