

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658252

研究課題名(和文) フィロウィルスの粒子形成過程を阻害する抗体の研究

研究課題名(英文) Antibody-mediated inhibition of filovirus budding

研究代表者

高田 礼人 (Takada, Ayato)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：10292062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マールブルグウイルス(MARV)の表面糖蛋白質(GP)特異的モノクローナル抗体を作出し、ウイルス出芽阻害活性の有無を解析した。その結果、通常の中和活性を持たない抗体の中に、MARV粒子の感染細胞からの出芽・放出を顕著に抑制する抗体が存在することが明らかとなった。これらの抗体存在下で増殖可能なエスケープ変異体を選択し、GPに導入されたアミノ酸変異を調べた結果、ムチン様領域の大規模な欠損またはfurin開裂部位の点変異が認められた。以上の結果より、抗体によるMARV感染抑制の新規メカニズムとMARVのユニークな免疫逃避メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Monoclonal antibodies (MAbs) specific to Marburg virus glycoprotein (GP) were produced to analyze their activity to suppress the virus budding. We found that some of the MAbs, which did not have a classical neutralizing activity, efficiently inhibited the budding and release of MARV particles from infected cells. A couple of escape variants selected by these MAbs had deletions of the mucin-like region in GP or single amino acid substitutions in the furin-recognition motif in GP. These results demonstrate a novel mechanism of antibody-mediated inhibition of MARV budding and the extraordinary structural flexibility and variability of MARV GP to escape from immunological pressure of antibodies.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御 抗体 中和 粒子形成 フィロウィルス

1. 研究開始当初の背景

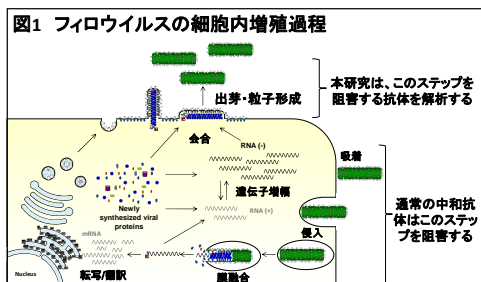
マールブルグウイルス (MARV) はエボラウイルスと共にフィロウイルス科に属し、霊長類動物に出血熱を引き起こす。現在、フィロウイルス感染症に対する予防・治療法は実用化されていない。エンベロープウイルスに対して、抗体による感染性中和のメカニズムは、「細胞の外」でウイルス粒子表面蛋白質に結合した抗体が、ウイルス受容体への結合あるいはウイルスエンベロープと宿主細胞膜の膜融合等を阻害することによってウイルスの細胞侵入を抑えるものが主である。通常の *in vitro* ウイルス中和試験は、予めウイルスと抗体を液体中で反応させ、その複合体を培養細胞に感染 (吸着) させ、どれだけのウイルスが細胞外で感染性を失っていたかを測定する。しかし申請者は最近、フィロウイルスの表面糖蛋白質 (GP) 遺伝子をもつ増殖性のシュードタイプウイルスを用いた感染実験で、通常の中和試験では活性が殆ど認められない抗体でも、ウイルス感染 (吸着・侵入) 後に培養細胞の上清に抗体を添加しておく、ウイルスの多段階増殖を著しく減少させる場合があることを見出した。本研究では、この現象に着目した。すなわち、抗体が細胞表面でウイルス蛋白質に結合し、ウイルスの出芽・粒子形成過程を抑えると推定される「細胞表面」で起こる抗ウイルス作用のメカニズムの解析という着想に至った。

2. 研究の目的

申請者がこれまでに作出したマールブルグウイルスの表面糖蛋白質 (GP) に対するモノクローナル抗体全てを用いて、(1) 通常の中和試験 (細胞外における中和) で活性を示さない抗体が、抗体存在下でウイルスを多段階増殖させることによって、ウイルスのプラック形成を抑えるか否かをスクリーニングする (図 1)、(2) プラック形成を抑える抗体を用いて、出芽・粒子形成過程を阻害するか否かを virus-like particle (VLP) の形成を指標に解析する、(3) 出芽・粒子形成過程を阻害する抗体に関して、エスケープミュータントのアミノ酸配列を解析するとともに「細胞表面」中和のメカニズムを解明する。

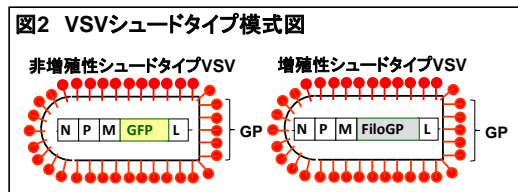
3. 研究の方法

本研究では、以下の方法で出芽・粒子形成を阻害する抗体を解析する (図 1)。



(1) モノクローナル抗体のスクリーニング

これまでに作出した MARV 表面糖蛋白質 GP に対するモノクローナル抗体について、非増殖性シュードタイプ Vesicular Stomatitis Virus (VSV) および増殖性シュードタイプ VSV (図 2) を用いて中和試験を行った。

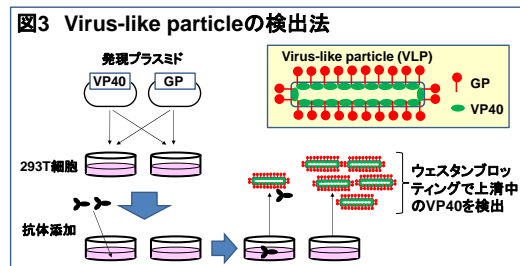


(2) 非中和抗体の抗ウイルス活性の解析

通常の中和活性の無い抗体に関して、細胞侵入過程以外における抗ウイルス活性を測定した。単層培養した Vero E6 細胞に増殖性シュードタイプ VSV を 1 時間吸着後、抗体 (1-100 µg/ml) を含む寒天培地を重層し、2-3 日後に形成されたプラックの数およびサイズを計測した。

(3) VLP 形成阻害試験

フィロウイルスのマトリックス蛋白質である VP40、各蛋白質である NP および GP を 293T 細胞に発現させると VLP が形成され、培養上清中に放出される現象を利用した。抗体存在下および非存在下で VLP を形成させ、培養上清中に含まれる VLP 量を、ウェスタンブロッティング (NP を検出) によって測定した (図 3)。



(4) 実際の MARV を用いた抗ウイルス活性測定試験

VLP 形成阻害が確認された非中和抗体について、実際 MARV で同様の現象が認められるか否かを、(3) と同様のウイルス粒子形成阻害試験によって確認した。本実験は、アメリカモンタナ州にある NIH, Rocky Mountain Laboratories の BSL4 施設で Heinz Feldmann 博士との共同研究として行った。

(5) VLP および VLP 産生細胞の形態観察

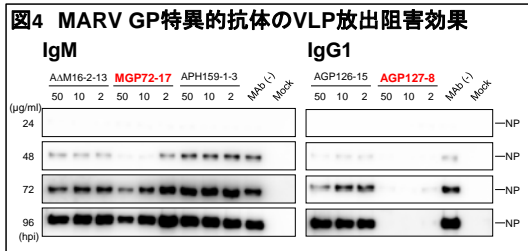
細胞表面での抗体のウイルス増殖阻害活性のメカニズムを解明するために、抗体存在下および非存在下で VLP を産生させた細胞を共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。

(6) エスケープミュータントの選択およびエピトープの決定

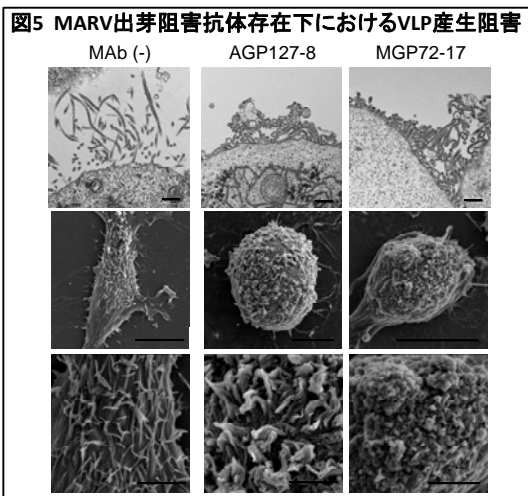
増殖性シュードタイプ VSV を利用して、エスケープミュータントの選択を行った。VSV の変異体の通常の出現頻度を考慮して、 $10^4 \sim 10^6$ 個の感染性ウイルスが含まれように調整した増殖型シュードタイプ VSV を単層培養した Vero E6 細胞に1時間吸着後、抗体を含む液体培地で多段階増殖させた。このステップを繰り返すことによって、エスケープミュータントを得た。得られたエスケープミュータントの GP の遺伝子およびアミノ酸配列を決定し、親株と比較することによって変異したアミノ酸を同定した。また、GP のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドに対する反応性からエピトープを決定した。

4. 研究成果

(1) MARV GP 特異的モノクローナル抗体を作成し、VLP 出芽阻害活性を指標にスクリーニングしたところ、2つの抗体(AGP127-8 および MGP72-17)存在下において、VP40、NP および GP 発現プラスミドを導入した細胞から放出される VLP の上清への放出量が顕著に抑制される事を見出した。同様の現象は実際の MARV 感染細胞から放出されるウイルス粒子にも認められた (図4)。さらに、これ



らの抗体存在下では、出芽途中の VLP 同士が重度に絡まりあい、細胞表面で凝集・堆積している様子が共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡観察によって確認された (図5)。

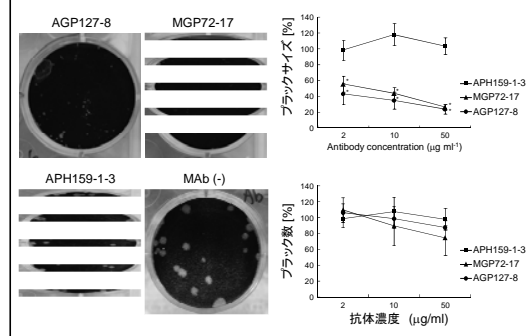


AGP127-8 抗体は最も強い出芽阻害活性を見せたが、その Fab 領域のみでは VLP の出芽は阻害しなかった。以上の結果から、AGP127-8

および MGP72-17 抗体は、細胞表面に発現された GP 分子間を複雑に架橋することにより、機械的に MARV の出芽を阻害したものと考えられた。

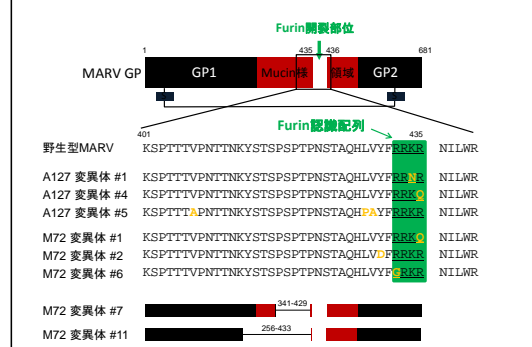
AGP127-8 存在下で、MARV GP をもつ増殖性シュードタイプ VSV のプラック形成を観察したところ、AGP127-8 は中和活性 (プラック数の減少) を示さないが、プラックサイズを著しく減少させることが判明した (図6)。

図6 MARV出芽阻害抗体存在下におけるVSVプラック形成阻害



(2) AGP127-8 および MGP72-17 抗体存在下でも増殖可能なエスケープ変異体を選択し、GP に導入されたアミノ酸変異を調べた (図7)。

図7 エスケープ変異体GPに認められたアミノ酸変異



MGP72-17 を用いて選択した変異体 GP の一部には、GP1 に存在する MLR の大規模な欠損が認められた。MGP72-17 のエピトープは欠損部位内に位置していたため、これらの変異体 GP は、エピトープを形成するペプチド鎖を丸ごと MLR の一部と共に喪失することによって抗体圧力から逃避したと考えられた。また、いくつかのエスケープ変異体 GP では、抗体のエピトープを形成するアミノ酸配列内に変異を持たないにもかかわらず、抗体との結合力が低下していた。これらの変異体 GP では、furin 認識配列内のアミノ酸に点変異が存在し、furin による開裂効率の低下が認められた。用いた出芽阻害抗体のエピトープは GP1 の furin 開裂部位近傍に存在することから、このエピトープは GP が furin によって開裂を受けた時のみ分子表面に露出される可能性が考えられた。すなわち、これらの変異体 GP においては、furin による開裂を受けていないため、エピトープが分子表面に露出しないために抗体が結合できなくなったことを示唆している。これまでに、MLR およ

び furin 認識配列を喪失しても、GP は基本的機能 (細胞への侵入仲介) を維持できることが報告されている。このような GP の性質は、MARV が抗体圧力から逃れるための高い変異許容能力を示唆しているかもしれない。

本研究で明らかにされた現象は、抗体による MARV 感染抑制の新規メカニズムであり、従来の中和試験では評価され得なかった AGP127-8 および MGP72-17 のような抗体も感染防御免疫に寄与している可能性を示唆している。本研究の成績は、フィロウィルスの予防・治療法開発のための新たな知見を与えるものである。また、今後他のウイルスに関しても、出芽を阻害する抗体が発見される可能性があり、抗体によるウイルス増殖阻害作用の新たな一般概念へと発展する可能性がある。

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 16 件)

- ① Muramatsu M, Yoshida R, Yokoyama A, Miyamoto H, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Manzoor R, Takada A. (2014) Comparison of antiviral activity between IgA and IgG specific to influenza virus hemagglutinin: increased potential of IgA for heterosubtypic immunity. *PLoS One* 9(1): e85582. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0085582
DOI:10.1371/journal.pone.0085582.
- ② Maruyama J, Miyamoto H, Kajihara M, Ogawa H, Maeda K, Sakoda Y, Yoshida R, Takada A. (2014) Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Iloivi virus. *J Virol* 88(1): 99-109. (査読有)
DOI: 10.1128/JVI.02265-13.
- ③ Kuhn JH, Bao Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brauburger K, Rodney Brister J, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P, Freiberg AN, Hensley LE, Hoenen T, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Saphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Volchkova VA, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. (2014) Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol* 159(5): 1229-1237. (査読有)
DOI: 10.1007/s00705-013-1877-2.
- ④ Bukreyev AA, Chandran K, Dolnik O, Dye JM, Ebihara H, Leroy EM, Mühlberger E, Netesov SV, Patterson JL, Paweska JT, Saphire EO, Smither SJ, Takada A, Towner JS, Volchkov VE, Warren TK, Kuhn JH. (2014) Discussions and decisions of the 2012–2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012–June 2013. *Arch Virol* 159(4): 821-830. (査読有)
PubMed PMID: 24122154.
- ⑤ Noyori O, Matsuno K, Kajihara M, Nakayama E, Igarashi M, Kuroda M, Isoda N, Yoshida R, Takada A. (2013) Differential potential for envelope glycoprotein-mediated steric shielding of host cell surface proteins among filoviruses. *Virology* 446(1-2): 152-161. (査読有)
DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.029.
- ⑥ Noyori O, Nakayama E, Maruyama J, Yoshida R, Takada A. Suppression of Fas-mediated apoptosis via steric shielding by filovirus glycoproteins. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 441(4): 994-998. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.018.
- ⑦ Muramatsu M, Yoshida R, Miyamoto H, Tomabechi D, Kajihara M, Maruyama J, Kimura T, Manzoor R, Ito K, Takada A. (2013) Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice. *PLoS One* 8(8): e71534. (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0071534.
- ⑧ Hoenen T, Groseth A, Callison J, Takada A, Feldmann H. (2013) A novel Ebola virus expressing luciferase allows for rapid and quantitative testing of antivirals. *Antiviral Res* 99(3): 207-213. (査読有)
DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.05.017.
- ⑨ Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A. (2013) Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein. *Virus Res* 176(1-2): 83-90. (査読有)
DOI: 10.1016/j.virusres.2013.05.004.
- ⑩ Takada A. (2013) Do therapeutic antibodies hold the key to an effective treatment for Ebola hemorrhagic fever? *Immunotherapy* 5(5): 441-443. (査読有)
DOI:10.2217/imt.13.29.
- ⑪ Kuhn JH, Bao Y, Bavari S, Becker S, Bradfute S, Brister JR, Bukreyev AA, Cai Y, Chandran K, Davey RA, Dolnik O, Dye JM, Enterlein S, Gonzalez JP, Formenty P,

- Freiberg AN, Hensley LE, Honko AN, Ignatyev GM, Jahrling PB, Johnson KM, Klenk HD, Kobinger G, Lackemeyer MG, Leroy EM, Lever MS, Lofts LL, Mühlberger E, Netesov SV, Olinger GG, Palacios G, Patterson JL, Paweska JT, Pitt L, Radoshitzky SR, Ryabchikova EI, Saphire EO, Shestopalov AM, Smither SJ, Sullivan NJ, Swanepoel R, Takada A, Towner JS, van der Groen G, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Warren TK, Warfield KL, Weidmann M, Nichol ST. (2013) Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for laboratory animal-adapted strains and variants of viruses assigned to the family Filoviridae. *Arch Virol* 158(6): 1425-1432. (査読有)
DOI: 10.1007/s00705-012-1594-2.
- ⑫ Kajihara M, Nakayama E, Marzi A, Igarashi M, Feldmann H, Takada A. (2013) Novel mutations in Marburg virus glycoprotein associated with viral evasion from antibody mediated immune pressure. *J Gen Virol* 94(Pt 4): 876-883. (査読有)
DOI:10.1099/vir.0.049114-0.
- ⑬ Wong G, Richardson JS, Pillet S, Patel A, Qiu X, Alimonti J, Hogan J, Zhang Y, Takada A, Feldmann H, Kobinger GP. (2012) Immune parameters correlate with protection against ebola virus infection in rodents and nonhuman primates. *Sci Transl Med* 4(158): 158ra146. (査読有)
DOI: 10.1126/scitranslmed.3004582.
- ⑭ Muto NA, Yoshida R, Suzuki T, Kobayashi S, Ozaki H, Fujikura D, Manzoor R, Muramatsu M, Takada A, Kimura T, Sawa H. (2012) Inhibitory effects of an M2-specific monoclonal antibody on different strains of influenza A virus. *Jpn J Vet Res* 60(2-3): 71-83. (査読有)
PubMed PMID: 23094582.
- ⑮ Kajihara M, Marzi A, Nakayama E, Noda T, Kuroda M, Manzoor R, Matsuno K, Feldmann H, Yoshida R, Kawaoka Y, Takada A. (2012) Inhibition of Marburg virus budding by nonneutralizing antibodies to the envelope glycoprotein. *J Virol* 86(24): 13467-13474. (査読有)
DOI: 10.1128/JVI.01896-12.
- ⑯ Lee PS, Yoshida R, Ekiert DC, Sakai N, Suzuki Y, Takada A, Wilson IA. (2012) Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(42): 17040-17045. (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1212371109.
- immunity against filovirus infection. 6th International Symposium on Filoviruses. Galveston, 2014年4月2日
- ② 高田礼人. フィロウイルス感染症. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸、2013年11月12日
- ③ 野依修、中山絵里、丸山隼輝、吉田玲子、高田礼人. フィロウイルス糖蛋白質によるアポトーシスシグナル阻害作用. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸、2013年11月10日
- ④ 黒田誠、藤倉大輔、野依修、中山絵里、梶原将大、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人. TIM-1の多型が及ぼすフィロウイルスの細胞感受性に対する影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸、2013年11月10日
- ⑤ 丸山隼輝、前田健、小川寛人、迫田義博、高田礼人. Lloviu virusの表面糖タンパク質GPの性状解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸、2013年11月10日
- ⑥ 吉田玲子、Katendi Changula、野依修、Andrea Marzi、宮本洋子、石島麻理、Heinz Feldmann、Aaron S. Mweene、高田礼人. エボラウイルス核タンパク質のエピトープ解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸、2013年11月10日
- ⑦ Takada A. Recent advances in filovirus research: Epidemiology and antiviral strategies. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2013年9月13日
- ⑧ Takada A. Recent Topics of Filovirus Research. International Conference in Medicine and Public Health 2013 (ICMPH2013) “Healthy Society beyond Frontiers”. Bangkok, 2013年6月25日
- ⑨ Kajihara M, Marzi A, Nakayama E, Noda T, Igarashi M, Kuroda M, Manzoor R, Matsuno K, Feldmann H, Yoshida R, Kawaoka Y, Takada A. Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, 2013年6月20日
- ⑩ Yoshida R, Marzi A, Suzuki Y, Igarashi M, Feldmann F, Brining D, Feldmann H, Takada A. Protective Efficacy of Neutralizing Monoclonal Antibodies in a Nonhuman Primate Model of Ebola Hemorrhagic Fever. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, 2013年6月20日
- ⑪ Muramatsu M, Yoshida R, Takada A. Heterosubtypic antiviral activity of influenza virus hemagglutinin-specific antibodies. Fifteenth International Conference on Negative Strand Viruses. Granada, 2013年6月20日
- ⑫ Kajihara M, Marzi A, Nakayama E, Noda T,

[学会発表] (計 19 件)

- ① Takada A. Role of antibodies in protective

Igarashi M, Kuroda M, Manzoor R, Matsuno K, Feldmann H, Yoshida R, Kawaoka Y, Takada A. Antibody-mediated inhibition of Marburg virus budding. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore, 2013 年 3 月 13 日

- ⑬ Takada A. Serological survey of antibodies to filoviruses in wild animals. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013. Tokyo 2013 年 1 月 24 日
- ⑭ 高田礼人. エボラおよびマールブルグウイルス. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月 13 日
- ⑮ 野依修, 松野啓太, 梶原将大, 中山絵里, 五十嵐学, 磯田典和, 吉田玲子, 高田礼人. フィロウイルス糖蛋白質による宿主細胞表面分子の立体的遮蔽現象の解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月 13 日
- ⑯ 吉田玲子, Marzi Andrea, 宮本洋子, 石島麻里, 鈴木定彦, 五十嵐学, 中山絵里, 黒田誠, Feldmann Heinz, 高田礼人. アカゲザルモデルを用いたエボラ出血熱に対する中和モノクローナル抗体の防御効果. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月 13 日
- ⑰ 梶原将大, Marzi Andrea, 中山絵里, 野田岳志, 黒田誠, Manzoor Rashid, Feldmann Heinz, 吉田玲子, 河岡義裕, 高田礼人. 抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害. 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪、2012 年 11 月 13 日
- ⑱ 梶原将大, Andrea Marzi, 中山絵里, 野田岳志, 黒田誠, Rashid Manzoor, 松野啓太, Heinz Feldmann, 吉田玲子, 河岡義裕, 高田礼人. 抗体によるマールブルグウイルスの出芽阻害. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 岩手、2012 年 9 月 14 日
- ⑲ Takada A. Serological evidence of filovirus infection in Indonesian orangutans. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative, Medical Science Program. Beppu, 2012 年 6 月 19 日

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 大西なおみ, 東秀明, 高田礼人 (2014) エボラ出血熱ワクチン・炭疽ワクチン、最新医学 69(4): 865-871、最新医学社
- ② 梶原将大, 小川寛人, 高田礼人 (2013) フィロウイルスの生態、実験医学 31(19): 3054-3060、羊土社
- ③ 高田礼人 (2012) 特集 Negative Strand RNA virus のウイルス学 フィロウイルス、ウイルス 62(2): 197-208、日本ウイルス学会

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページでの研究成果公開。

<http://www.czc.hokudai.ac.jp/epidemiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 礼人 (TAKADA AYATO)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号：10292062

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 公人 (ITO KIMIHIITO)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授
研究者番号：60396314

五十嵐 学 (IGARASHI MANABU)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教
研究者番号：10374240