

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892002

研究課題名(和文)抗体によるウイルスの出芽阻害メカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying antibody-mediated inhibition of virus budding

研究代表者

梶原 将大(Kajihara, Masahiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・研究員

研究者番号：70711894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：過去の研究を通してウイルスに対する出芽阻害抗体を得たが、阻害機序や防御免疫への寄与は不明であった。本研究を通して、鼻腔内免疫によりインフルエンザウイルスに対する放出阻害抗体が誘導されることがわかった。また、誘導されたIgA抗体を介したウイルス粒子の架橋により、新生ウイルスが細胞上に繫留される事が示唆された。このウイルス放出阻害が鼻腔内免疫による亜型間交差防御の機序である可能性が示唆された。また、出芽阻害抗体の有する防御効果をマールブルグ熱の齧歯類動物モデルを用いて検討した。その結果、出芽阻害抗体投与群において予後の改善が見られた。よって、出芽阻害抗体が生体の感染防御に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported antibody-mediated inhibition of virus budding from infected cells. However, the molecular basis and contribution to protective immunity of antibody-mediated budding inhibition are yet unknown. We found that antibodies induced by nasal immunization had inhibitory activity of influenza virus release from infected cells. It was morphologically suggested that the progeny virions were deposited on the infected cell surface by the tethering mediated by IgA antibody binding, which may be the molecular basis of cross-protective immunity induced by nasal immunization. We examined the involvement of budding inhibition antibodies in protective immunity through passive immunization of hamsters against Marburg virus infection. Immunization with budding inhibition antibody slightly improved clinical outcomes of infected hamsters, indicating that budding inhibition antibodies are also involved in protective immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フィロウイルス エボラウイルス マールブルグウイルス 出芽 抗体 表面糖蛋白質 エボラウイルス病 マールブルグ熱

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス病およびマールブルグ熱は重篤な出血熱を主徴とする人獣共通感染症である。これら感染症の発生はアフリカに集中しているが、感染したサルやヒトを介した輸入例もあり、公衆衛生上の脅威として世界的に重要視されている。その一方で、フィロウイルス感染症に対する効果的な予防・治療法は未だ確立されていない。

フィロウイルスは、ウイルス粒子表面に1種類の表面糖蛋白質(GP)を有する。GPは細胞侵入(宿主細胞への吸着や膜融合等)のみならず、ウイルスの放出(粒子形成や出芽)にも関与しており、フィロウイルスの生活環において非常に重要な役割を果たす。さらに、GPはフィロウイルスに対する中和抗体の唯一の標的であると考えられている。

従来、ウイルスの表面糖蛋白質に抗体が結合し、ウイルスの細胞侵入過程が阻害されることが抗体による一般的なウイルス中和メカニズムであると考えられてきた。しかし、申請者はこれまでの研究により、従来の中和活性は持たないがマールブルグウイルスの出芽を抑制する抗体がウイルス増殖を著しく減少させることを明らかにした(文献①)。しかし、抗体による出芽阻害の詳細なメカニズムは未だ不明である。また、出芽阻害抗体がウイルス感染症に対する生体における防御免疫に寄与しているか否かも明らかではなかった。

2. 研究の目的

近年の研究により、フィロウイルスに対する抗体の受動免疫によりフィロウイルス感染症を効果的に防御出来ることが霊長類のモデル動物を用いた感染実験により報告されている。また、インフルエンザウイルスの放出を阻害するオセルタミビルが非常に有効な抗ウイルス薬であることを考慮すると、本研究で焦点をあてる出芽阻害抗体がウイルス感染症に対する新たな予防・治療法へと応用できる可能性がある。また、従来の中和抗体と異なる作用点を標的とする抗体を用意することで、既存の抗体療法をより効果的に改良することが可能かもしれない。抗体によるウイルス出芽阻害の詳細なメカニズムを明らかにし、生体における防御免疫への寄与を明らかにすることにより、ウイルス感染症に対する新たな予防・治療法の開発へとつながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マールブルグウイルス以外のウイルスに対する出芽阻害抗体の存在を検討する

マールブルグウイルスだけでなく他のウイルスに対する出芽阻害抗体が存在するかどうかを明らかにするために以下の実験を実施した。

① エボラウイルスに対する出芽阻害抗体

マールブルグウイルスと同じくフィロウイルス科に属するエボラウイルスに対して出芽阻害抗体が誘導されることを確認するため、エボラウイルスのウイルス様粒子をマウスに免疫した。免疫マウスの脾臓細胞をマウスのミエローマ細胞と融合させることにより抗体産生ハイブリドーマ細胞の樹立を試みた。ハイブリドーマ培養上清を用いて、ELISA法によりエボラウイルスのGPに対する反応性をスクリーニングした。さらに、出芽阻害抗体産生細胞をスクリーニングし、出芽阻害活性を有する抗体を産生するハイブリドーマを複数回におよぼ限界希釈法により単一化した。

また、マールブルグウイルスに対する出芽阻害抗体のエピトープ領域(文献②)に相当するエボラウイルスGPのポリペプチドをマウスに免疫し、出芽阻害抗体が誘導されるかどうかを検討した。

② インフルエンザウイルスに対する抗体による出芽阻害

不活化インフルエンザウイルスをマウスに対して経鼻もしくは皮下免疫し、鼻腔洗浄液および血清中に存在する抗体のウイルス出芽阻害活性を検討した。また、インフルエンザウイルスのHAに対するIgGおよびIgAモノクローナル抗体を用いて、インフルエンザウイルスに対する出芽阻害活性を比較した。

(2) 出芽阻害抗体の防御免疫への寄与

マールブルグウイルスに対する出芽阻害抗体をハムスターに受動免疫し、免疫-1、0、1、2もしくは3日目に齧歯類動物に馴化させたマールブルグウイルスをハムスターに接種した。その後、14日間に渡り臨床症状を観察し、出芽阻害抗体の感染防御効果および防御免疫への寄与を検討した。

4. 研究成果

(1) マールブルグウイルス以外のウイルスに対する出芽阻害抗体の存在を検討する

① エボラウイルスに対する出芽阻害抗体

エボラウイルスのウイルス様粒子を免疫したマウスの脾臓およびミエローマ細胞の融合によりハイブリドーマ細胞を得た。培養上清を用いたELISAによるスクリーニングの結果、136検体がエボラウイルスのGPに対して反応性を示した。細胞を単一化した後、精製したモノクローナル抗体を用いて出芽阻害試験を実施した。残念な事に、いずれの抗体もエボラウイルスに対して出芽阻害活性を示さなかった。また、出芽阻害抗体のエピトープに相当するポリペプチドを免疫したマウス血清もエボラウイルスに対する出芽阻害活性を示さなかった。これらのデータは、仮にエボラウイルスに対する出芽阻害抗体が存在したとしても、宿主の産生する抗

GP 抗体における出芽阻害抗体の割合は少ないことを示唆している。

② インフルエンザウイルスに対する抗体による出芽阻害

経鼻免疫したマウスから採集した鼻腔洗浄液を用いて、インフルエンザウイルスのプラーク形成阻止試験を実施した。その結果、プラーク形成は阻害されないものの、プラークサイズが縮小することがわかった。また、インフルエンザウイルスの HA に対する同一のモノクローナル抗体から IgG および IgA 抗体を調整し、ウイルスの出芽阻害試験を実施した。その結果、IgA 抗体存在下においてインフルエンザウイルスの感染細胞からの放出が阻害されることがわかった。電子顕微鏡を用いた形態学的観察の結果、インフルエンザウイルスが感染細胞上に堆積し、培養上清への放出が抑制されていることが示唆された (図 1)。これらのデータは、ウイルス粒子同士が鼻腔粘膜上に分泌された IgA 抗体の結合を介して複雑に架橋され、細胞上へ繫留されていることを示唆している。インフルエンザウイルスの経鼻接種によって、免疫ウイルスとは異なる垂型のウイルスに対する交差防御免疫が誘導される事は以前から報告されていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究で示した IgA 抗体による架橋を介したウイルスの出芽阻害が、垂型間交差防御のメカニズムの一端を担っている可能性が示唆された。

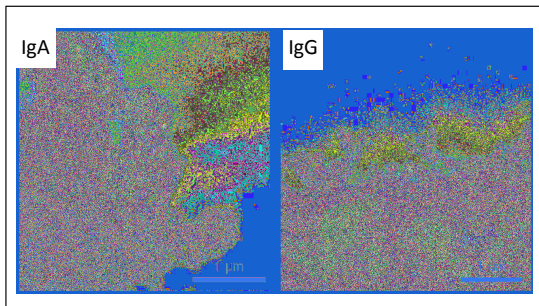


図1 IgAおよびIgG抗体存在下におけるインフルエンザウイルスの出芽の様子

(2) 出芽阻害抗体の防御免疫への寄与

マールブルグウイルスに対する出芽阻害抗体および従来の中和抗体をハムスターに受動免疫した。さらに、免疫-1、0、1、2 もしくは3日目に齧歯類動物に馴化したマールブルグウイルスをハムスターに接種し、その臨床症状を観察した。その結果、出芽阻害抗体投与群においてわずかに予後の改善が認められた (図 2)。今後、更なる検討が必要ではあるが、出芽阻害抗体が少なくとも防御免疫に寄与していることが示唆された。

また、本研究によりもたらされた副次的な成果ではあるが、エボラウイルスの核蛋白質 NP に対するモノクローナル抗体を複数樹立し、NP におけるエピトープ領域を明らかにした。また、複数種のエボラウイルスの NP

に結合能を有するモノクローナル抗体を用いてエボラウイルス病の迅速診断キットを試作した。今後、本試作キットの有効性の検証を予定している。

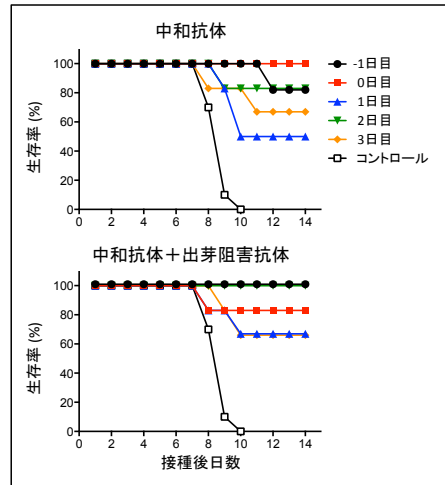


図2 出芽阻害抗体の防御効果試験

<引用文献>

① [Kajihara M, Marzi A, Nakayama E, Noda T, Kuroda M, Manzoor R, Matsuno K, Feldmann H, Yoshida R, Kawaoka Y, Takada A, Inhibition of Marburg virus budding by nonneutralizing antibodies to the envelope glycoprotein, Journal of Virology, Vol. 86, Issue 24, 2012, pp. 13467-13474](#)

② [Kajihara M, Nakayama E, Marzi A, Igarashi M, Feldmann H, Takada A, Novel mutations in Marburg virus glycoprotein associated with viral evasion from antibody mediated immune pressure, Journal of General Virology, Vol. 94, 2013, pp. 876-883](#)

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 14 件)

① [Kajihara M, Takada A, Host Cell Factors Involved in Filovirus Infection, Current Tropical Medicine Reports, 査読有, Vol. 2, Issue 1, 2015, pp. 30-40, DOI: 10.1007/s40475-015-0039-x](#)

② [Changula K, Yoshida R, Noyori O, Marzi A, Miyamoto H, Ishijima M, Yokoyama A, Kajihara M, Feldmann H, Mweene AS, Takada A, Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the Ebola virus nucleoprotein, Virus Research, 査読有, Vol. 176, Issue 1-2, 2013, pp. 83-90, DOI: 10.1016/j.virusres.2013.05.004](#)

③Muramatsu M, Yoshida R, Yokoyama A, Miyamoto H, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Manzoor R, Takada A, Comparison of antiviral activity between IgA and IgG specific to influenza virus hemagglutinin: increased potential of IgA for heterosubtypic immunity, PLoS ONE, 査読有, Vol. 9, Issue 1, 2014, e85582, DOI: 10.1371/journal.pone.0085582

④Muramatsu M, Yoshida R, Miyamoto H, Tomabechi D, Kajihara M, Maruyama J, Kimura T, Manzoor R, Ito K, Takada A, Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice, PLoS ONE, 査読有, Vol. 8, Issue 8, 2013, e71534, DOI: 10.1371/journal.pone.0071534

〔学会発表〕(計 11 件)

①村松美笑子、吉田玲子、横山文香、宮本洋子、梶原将大、丸山隼輝、直享則、Rashid Manzoor、高田礼人、A型インフルエンザウイルスヘマグルチニン得異的IgA抗体の亜型間交差抗ウイルス活性、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10~12日、パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

②Muramatsu M, Yoshida R, Yokoyama A, Miyamoto H, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Manzoor R, Takada A, Comparison of antiviral activity between IgA and IgG: High potential of IgA antibodies specific to influenza virus hemagglutinin for heterosubtypic immunity, The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2014年9月23~26日, Nara Prefectural New Public Hall (Nara)

③ Nao N, Kajihara M, Maruyama J, Kimura T, Manzoor R, Muramatsu M, Yoshida R, Okamatsu M, Kida H, Takada A, Different pathogenicity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses determined by a single amino acid in the M1 protein, XVI International Congress of Virology, 2014年7月27日~8月1日、Montreal (Canada)

〔図書〕(計 3 件)

①梶原将大、高田礼人、医学書院、生体の科学、2015、印刷中(総ページ数5)

②梶原将大、羊土社、実験医学 第33巻第8号、2015、pp. 1344-1346

③梶原将大、小川寛人、高田礼人、羊土社、実験医学 第31巻第19号、2013、pp.

3054-3060

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶原 将大 (KAJIHARA, Masahiro)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：70711894