

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670228

研究課題名(和文)インフルエンザ万能ワクチン開発

研究課題名(英文)Universal vaccine against influenza virus

研究代表者

福山 英啓 (Fukuyama, Hidehiro)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70303956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザは、毎年季節性に流行するウイルス感染症であるが、ときに世界的流行な状態に陥り、大量の罹患者及び死者がでるリスクが常にある。問題は、変異などにより生まれた新型ウイルスの急速な流行のリスクを、季節性ワクチンが必ずしも下げるわけではないところにある。本研究では、従来の不活化ワクチンを用いるのではなく、日本で初めて樹立された「万能抗体」を鋳型に、人工的にこの抗体に結合するペプチドを高速計算機によりデザインし、合成し、ワクチン抗原として用いることで「万能抗体」と類似する機能をもつ抗体を誘導するワクチン開発を目指した。本研究にて、異なるウイルス種に対して中和活性を示すペプチドを同定した。

研究成果の概要(英文)：Annual flu vaccination protects from seasonal influenza virus infection but doesn't fully have effects on emerging new viruses such as avian H5 influenza virus. Vaccine against broad spectrum of influenza virus strains is ideal. Twenty years ago, a Japanese scientist isolated a "universal antibody" in the first time in the world. This antibody can block infections of several influenza virus strains. Using this unique antibody as a template, we design artificial peptide antigen in silico for universal vaccine. We expect that this antigen can induce the universal antibody-like antibodies to protect from various influenza virus strains. We gained a proof-of-concept data that some of synthetic peptides bind to the universal antibody and could induce neutralizing antibodies against two influenza virus strains.

研究分野：免疫

キーワード：ワクチン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎年季節的に流行するウイルス感染症である。この流行により、現在でも、世界で300万人から500万人の人が感染し、25万人から50万人が死に至る。これ以上に危惧されていることは、1918年に起こった4000-5000万人が死亡したと推定されるスペイン風邪のような例に見られるように、**パンデミック(世界的流行)な状態に陥り、大量の罹患者及び死者がでるリスクが常に存在することである。**

インフルエンザは型、亜型等を含め、18種類もの異なるウイルスに分類されている。このウイルスの特徴として、多型かつ変異が起りやすいことが知られている。ワクチンは、WHO主導で、毎年、世界中で流行しているインフルエンザウイルス種を予測し、限定したウイルス種についてのみ、各製薬会社でワクチンが製造されている(季節性ワクチン)。最大の問題点は、投与した季節性ワクチンが、「ドリフト・シフト」などによって新たに生まれ、急速に広がる新型ウイルスによるパンデミックのリスクを必ずしも下げる役割を担わないというところにある。特に近年東南アジア諸国で発生している鳥インフルエンザはパンデミックへの危険性が示唆されていることから、種特異的なワクチンだけではなく、この新型ウイルスによる**パンデミックの予防に繋がる万能ワクチンの開発が急務である。**

興味深いことに、20年前に、様々なインフルエンザウイルス感染を抑制する能力を持つ「万能抗体」産生ハイブリドーマが世界で初めて日本で樹立されている(J. Virol., 1993, Okuno)。この万能抗体はマウスにおいて、H1N1および鳥インフルエンザウイルスH5N1に対して、高い予防効果を示した(J. Virol., 1994, Okuno; Antiviral Res., 2010, Sakabe)。最近、この「万能抗体」のインフルエンザウイルスが、HAの「**stem**」部位の構造を認識することが明らかになった(JVI. 2013, Dreyfus)。

2. 研究の目的

本研究では、従来の不活化ワクチンを用いるのではなく、既存の「万能抗体」を鋳型に、**人工的にこの抗体に結合するペプチドをデザイン、合成し、ワクチン抗原として用いる**ことで「万能抗体」と類似する機能をもつ抗体を産生する記憶B細胞・抗体産生細胞を体内で効率的に作らせる方法を開発する。この方法を基礎に、将来的に実用可能な「万能ワクチン」の開発を目指す。

3. 研究の方法

高速計算機による抗体と人工ペプチドの親和性の計測を行うにあたり、4つの異なるアルゴリズムを試した。このアルゴリズムは、アミノ酸のもつ電荷、体積、疎水性等の特性の計算に加え、水分子を充填した仮想の空間

内でのタンパク分子の“ゆらぎ”も考慮に入れたMolecular Dynamicと呼ばれる方法を導入している。また、実際の抗体とペプチドの結合親和性は、Surface plasmon resonance (SPR)法を用いて結合・解離速度定数を測定した。マウスへの免疫は、人工ペプチドとKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)を架橋させ、アジュバントとともに皮下投与した。Boost後のマウス血清を用いて、インフルエンザウイルスH1N1及びH2N2を用いて、血清中の中和活性の力価を調べた。また、人工ペプチド抗原と抗体との複合体の構造を開けらかにする目的で、ペプチドと「万能抗体」C179との結合時または、ペプチド単独の構造をNMRを用いて調べた。また、ペプチド-抗体の結晶化を試みた。

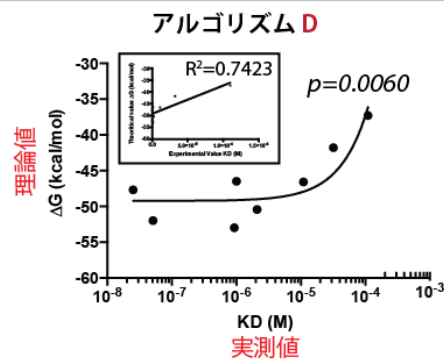
4. 研究成果

(1) どのアルゴリズムを使うのか

最初に、4つの異なるアルゴリズムを用いて、8つの任意の12アミノ酸長からなるペプチドとの結合親和性を算出する。この際、任意の配列は、C179「万能抗体」を鋳型に、様々な種のインフルエンザウイルスのHAタンパク結合部位を参考に、作成した。この任意のペプチドを合成し、SPR法を用いて、その結

図1 アルゴリズムの決定

アルゴリズム	A	B	C	D
R square	0.1501	0.212	0.5377	0.7423
P value	0.3431	0.251	0.0384	0.006
N	8	8	8	8



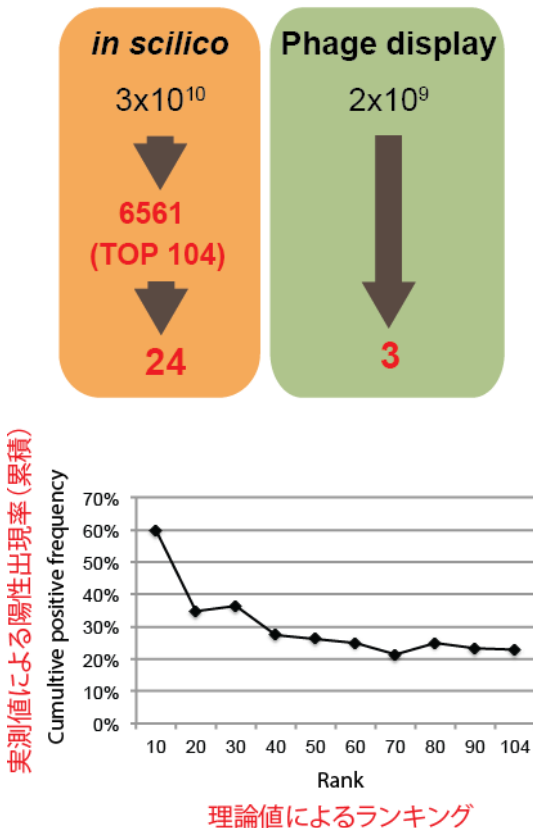
合親和性を、計測した。これらの理論値と実測値の相関を図1に示す。結果、アルゴリズムDによって得られた方法で、最も高い相関が見られたことから、この方法を元に、今後の実験を行うことにした。

(2) ペプチド選別

3 x 10¹⁰ のペプチドライブラリーを計算機上で作成し、上記のアルゴリズムを用いて、C179抗体との結合親和性を算出し、ランクをつけた。ライブラリー中、6561個のペプチドが計算上、C179抗体と結合した。このうち上位ランク104個のペプチドを実際に合成し、SPR法で、C179抗体との結合を見た。高いランクに位置する群で、C179抗体と結合するペプチドの割合が多いことがわかった(図2)。104個のうち、24個のペプチドがC179抗体に結合した。バツ

クアックプランとして、phage display 法により、 2×10^9 のライブラリーから、3つの12アミノ酸長のペプチドを同定している。

図2 C179に結合するペプチドの選別



実測値による陽性出現率(累積)

理論値によるランキング

(3) 人工ペプチドの交差性中和活性誘導能の検証

*in silico*で得られたペプチド24個の中から、結合親和性の高い8つのペプチドと、phage display法で得られた3つを合わせ、合計11個について、免疫を行った。Boost後の血清を用いて、培養細胞への感染率を調べた(図3)。

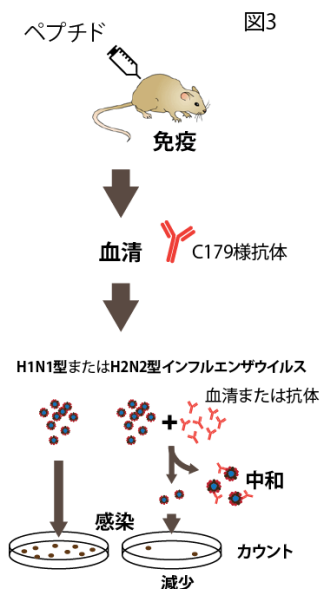
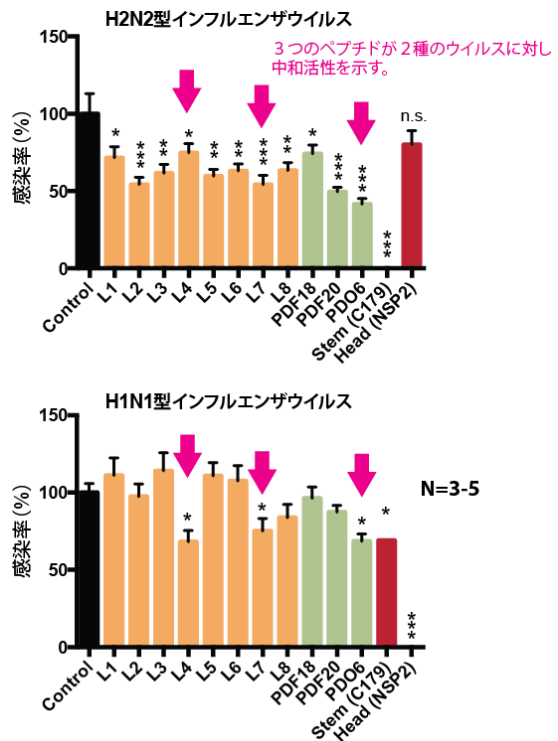


図4に結果を示すように、C179抗体はH2N2型インフルエンザウイルスに対して、特に中和活性を示すことが知られている。一方、



NSP2抗体は、H1N1型インフルエンザに特異的に中和活性を示す。L1-8は*in silico*で得られたペプチド免疫によって誘導された血清(オレンジ色)またPDF18、PDF20、PD06は、phage displayによって得られたペプチドで誘導された血清(緑色)を示す。Controlには非免疫マウス血清を用いた(黒色)。ペプチドによって誘導された血清すべてで、H2N2型インフルエンザウイルスに対して、中和活性を示した。H1N1型インフルエンザウイルス(A/California/2009pdm)に関しては、C179抗体は、H2N2型インフルエンザウイルスに対する中和活性ほどではないが、優位に中和活性を示した。すべての血清の中で、L4、L7、PD06の3つのペプチドで誘導された血清で、このH1N1型インフルエンザウイルスに対しても、C179抗体程度の中和活性が見られた。このことから、本研究で、計算機による人工ペプチド抗原の選別とこの抗原を免疫することで「万能抗体」様の抗体産生は可能であることがわかった。ただ、現在の状況では、実用的な、力価が出ていない。また、ペプチド-抗体複合体の構造解析については、NMRによる解析、及び結晶化などを試みたが、はっきりとした構造は、得られなかった。このことから、現在、すでに構造を取ることが知られているペプチドを改変し、それを鋳型に、本研究で使用したアルゴリズムを用いて、再度、ペプチドの選別を行っている。

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3件)

1. Kuroda, Y., A. Suenaga, Y. Sato, S. Kosuda, and M. Taiji. 2016. All-atom molecular dynamics analysis of multi-peptide systems reproduces peptide solubility in line with experimental observations. *Scientific reports* 6:19479. 査読有

2. Okamura, H., H. Nishimura, T. Nagata, T. Kigawa, T. Watanabe, and M. Katahira. 2016. Accurate and molecular-size-tolerant NMR quantitation of diverse components in solution. *Scientific reports* 6:21742. 査読有

3. Shinnakasu, R., T. Inoue, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Adachi, M. Nakayama, Y. Takahashi, H. Fukuyama, T. Okada, and T. Kurosaki. 2016. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nature immunology* 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 英啓 (FUKUYAMA, Hidehiro)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命
医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70303956

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

永田 崇 (NAGATA, Takashi)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号：10415250

末永 敦 (SUENAGA, Atsushi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創
薬分子プロファイリング研究センター・

招聘研究員

研究者番号：90415191