様　式　C－19、F－19、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 28 年　 6 月 24 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：２６８５０１８０

研究課題名（和文）全てのHA亜型のインフルエンザウイルスHA蛋白質を中和するユニバーサル抗体の作出

研究課題名（英文）Establishment of monoclonal antibodies that neutralize all HA subtypes of influenza A viruses

研究代表者
村本　裕紀子（MURAMOTO, Yukiko）

京都大学・ウイルス研究所・特定研究員

研究者番号：７０４３６５６７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：全亜型のA型インフルエンザウイルスHA蛋白質を中和するモノクローナル抗体を作出することを目的とした。初めに、抗体作出の免疫抗原として、表面にHAstalkを持つHIV Gagウイルス様粒子を検討した。HAstalk領域をHIV Gagとともに細胞に発現させると、HAstalkは放出されたGagウイルス様粒子に取り込まれた。しかし、ウイルス様粒子を精製しても免疫必要量を得ることができなかったため、免疫抗原を精製インフルエンザウイルスに変更し検討した。免疫したマウスの脾臓を採取して細胞融合した。現在、免疫抗原とは異なる亜型のHAを使用して様々なHA亜型を認識する抗体を選別している。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study is to establish monoclonal antibodies which recognize all subtypes of influenza A virus HAs. First, we assessed virus-like particles of HIV Gag which possess stalk region of HA protein as an immunogen. HA stalk protein was detected on the surface of Gag virus-like particles generated by the expression of both HIV Gag and HA stalk in mammalian cells. However, we found that the amount of the virus-like particles was not sufficient for immunization. Then, we immunized mice with purified influenza A virus particles. After the fusion process of spleen cells with myeloma cells, antibodies against HA have been screened using several subtypes of HA proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス

１．研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスはウイルス表面の糖蛋白質 HA と NA の血清型により、H1 から H18 まで、N1 から N11 までに分類される。そのうちヒトでは H1N1 と H3N2 亜型のウイルスが毎年冬に流行し、患者に呼吸器疾患や全身性の疾患を引き起こす。さらに、歴史的には 10 年から 50 年間隔で、鳥などのインフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスのリアソートメント（遺伝子再集合）により、それまでヒトで流行していなかった HA 亜型のウイルス（新型インフルエンザウイルス）が発生してヒトに感染するようになり、パンデミックを引き起こしてきた。現在、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスや H7N9、H5N6、H10N8 などの鳥インフルエンザウイルスが散発的にヒトに感染して致死率の高いインフルエンザを引き起こしており、新型インフルエンザの発生が危ぶまれている。

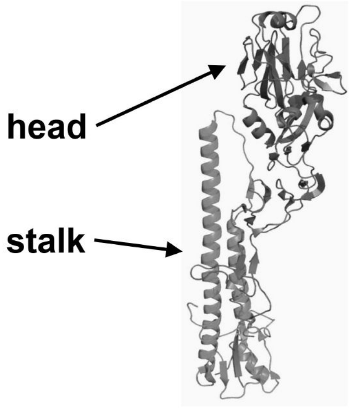
インフルエンザの治療にはウイルス表面に存在する M2 蛋白質や NA 蛋白質の阻害薬が使用されてきた。しかし、これらの薬剤に対して耐性を示すインフルエンザウイルスが出現している。M2 阻害薬に対する耐性ウイルスはすでに世界中に蔓延しており、M2 阻害薬は日本では治療のために使用されることはなくなった。また、現在治療に用いられている NA 阻害薬に対する耐性ウイルスも散発的に出現しているが、2009 年には耐性ウイルスが世界的に流行し、大きな問題となった。したがって、M2、NA 以外のウイルス蛋白質に作用する新規の抗インフルエンザ薬を開発する必要がある。

抗体医薬品は、一つの抗体が一つの抗原を認識する特異性を利用した、副作用の少ない効果的な治療薬として注目されているが、インフルエンザの治療法としては今だ実用化されていない。インフルエンザウイルスの主要抗原である HA 蛋白質の抗原性が、その HA 亜型により、さらに同一亜型内でも、大きく異なることが抗体医薬品開発の障害となる。

HA は、血清型の違いにより、H1 から H18 までの HA 亜型に分類される。HA は I 型の膜蛋白質であり、細胞外領域は球状の head 領域と棒状の stalk 領域からなる（図１）。HA はインフルエンザウイルスに対する液性免疫の主要ターゲットであり、インフルエンザウイルスの感染またはワクチン接種により、主に HA の head 領域に対する抗体が作られる。HA は免疫システムから逃れるために変異を重ねた結果、その抗原性が変化する。

一方、これまでにわずかではあるが、複数の亜型の HA を中和するモノクローナル抗体

図1. HAの立体構造



が、ワクチンを接種したヒトのメモリーB 細胞・形質細胞や免疫したマウスから分離されている（Okuno et al. J Virol. 1993; Throsby et al. PLoS ONE, 2008; Sui et al. Nat Struct Mol Biol. 2009; Corti et al. J Clin Invest. 2010; Wrammert et al. J Exp Med. 2011; Li et al. PNAS, 2012）。さらに、全ての（H1-H16）を認識し、調べた全ての HA を中和するモノクローナル抗体が１クローン分離されたと報告された（Corti et al. Science, 2011）。これらのモノクローナル抗体は HA の stalk 領域を認識していた。したがって、HA 亜型間で高度に保存された領域である stalk 領域を免疫することにより、全ての HA を中和するモノクローナル抗体を作出することが可能なのではないかと考えられる。

２．研究の目的

本研究では、HA 亜型間で高度に保存された HAstalk 領域をマウスに免疫し、抗体産生ハイブリドーマを作出することにより、全ての HA 亜型のインフルエンザウイルス HA 蛋白質を中和するモノクローナル抗体を多数作出することを目指した。

３．研究の方法

本研究では、マウスに HAstalk を免疫し、脾臓から採取したリンパ球をミエローマ細胞と細胞融合させ、抗体産生ハイブリドーマを作出する。産生されたモノクローナル抗体について、免疫抗原とは異なる亜型の HA を持つウイルスもしくは精製 HA 蛋白質を抗原とした ELISA を、全ての HA 亜型についてそれぞれ行い、その HA を認識するかどうかを調べる。このように、抗体が認識する全ての HA 亜型を決定することにより、全ての（または複数の）HA 亜型のインフルエンザウイルス HA 蛋白質を認識する抗体を多数選出す

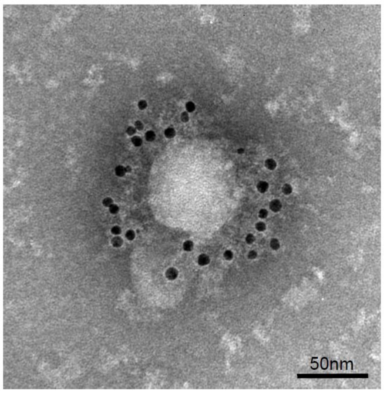
る。さらに、細胞培養においてさまざまなHA 亜型のインフルエンザウイルスの増殖を抑制する（つまりさまざまな亜型の HA 蛋白質を中和する）抗体を選出し、また、マウスにおけるインフルエンザウイルス増殖を抑制する（つまりインフルエンザに対する治療効果のある）抗体を選出する。

今回、HAstalk 領域に対するモノクローナル抗体作製のための免疫抗原として、表面にHAstalk を持つ HIV Gag ウイルス様粒子を検討した。

４．研究成果

はじめに、免疫抗原について検討した。H1 亜型のインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)の HA から head 領域をさまざまな長さで欠損させた HAstalk 領域の発現プラスミドを作製した。それらプラスミドを細胞にトランスフェクションしたところ、細胞内に stalk 蛋白質をウェスタンブロット法により検出することができた。さらに、HIV Gag 発現プラスミドとともに、HAstalk 発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、培養上清中に stalk 蛋白質を検出することができた。また、その培養上清を免疫電子顕微鏡法により観察したところ、HIV Gag ウイルス様粒子上に HAstalk を検出することができた（図２）。

図２．Gagウイルス様粒子上のHAstalk



抗HAstalk抗体（金コロイド）で染色した.

次に、HIV Gag 発現プラスミドと HAstalk 発現プラスミドを大量の培養細胞にトランスフェクションし、培養上清中の HAstalk-Gag ウイルス様粒子の精製を、シクロースを用いたウイルス粒子精製法により試みた。しかし、得られたウイルス様粒子の蛋白質量を調べたところ、免疫必要量には到底及ばなかったため、マウスの免疫源として HAstalk-Gag ウイルス様粒子を利用することを断念した。

そこで、新たなマウスの免疫抗原として、精製インフルエンザウイルス粒子を用いることを検討した。A 型インフルエンザウイルス A/Victoria/361/2011 (H3N2) を大量に増殖させ、シクロースを用いてインフルエンザウイルス粒子を精製した。免疫必要量を得られたため、BALB/c マウスに免疫した。マウスから血液を採取し、免疫源であるインフルエンザウイルス Victoria 株に対する抗体価を ELISA により調べたところ､抗体価が十分に上がっていることがわかった。そこで、マウスから脾臓を採取し、脾臓リンパ球とミエローマ細胞との細胞融合を行った。現在、融合した細胞を増殖させ、産生するモノクローナル抗体の評価を行っている。

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　２件）

① Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, <u>Muramoto Y</u>, Watanabe S, Watanabe T,,Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y.
An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation. PLoS Pathog. 11:e1004856. 2015. doi: 10.1371/journal.ppat.1004856. 査読有

② <u>Muramoto Y</u>, Shoemaker JE, Le MQ, Itoh Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Imai H, Uraki R, Takano R, Kawakami E, Ito M, Okamoto K, Ishigaki H, Mimuro H, Sasakawa C, Matsuoka Y, Noda T, Fukuyama S, Ogasawara K, Kitano H, Kawaoka Y.
Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in nonhuman primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. J Virol. 88:8981-8997. 2014.　査読有

〔学会発表〕（計　５件）

① <u>村本裕紀子</u>.
高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染による重症化には感染初期の ISGs の発現が関与する. Fourth Negative Strand Virus-Japan Symposium. 2015 年 1 月 20 日 ラグナガーデンホテル（沖縄県宜野湾市）

② <u>村本裕紀子</u>、Jason E. Shoemaker、Le Thi Quynh Mai、伊藤靖、田村大輔、坂井（田川）優子、今井博貴、岡本貴世子、石垣宏仁、小笠原一誠、北野宏明、河岡義裕.
高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染したカニクイザルの宿主応答. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 12 日　パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

③ 村本裕紀子、Jason E. Shoemaker、Le Thi Quynh Mai、 伊藤靖、田村大輔、坂井（田川）優子、今井博貴、岡本貴世子、石垣宏仁、小笠原一誠、北野宏明、河岡義裕. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染したカニクイザルの宿主応答. 第 157 回日本獣医学会学術集会　2014 年 9 月 12 日　北海道大学（北海道札幌市）

④ Masahiro Nakano, Yukihiko Sugita, Keiko Shindo, Yukiko Muramoto, Noriyuki Kodera, Yoshihiro Kawaoka, Matthias Wolf, Takeshi Noda.
Ultrastructural analysis of influenza virus genome transcription. JST CREST-PRESTO joint international symposium. Nov. 5, 2015. The University of Tokyo (Bunkyo-ku, Tokyo)

⑤ Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y.
Detecting emergent properties in genomic data: Consolidating inflammatory response dynamics. 6th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells. April 7, 2016. München (Germany).

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等　なし

６．研究組織

(1)研究代表者
村本　裕紀子（MURAMOTO, Yukiko）
京都大学・ウイルス研究所・特定研究員
研究者番号：７０４３６５６７

(2)研究分担者
なし　（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
なし　（　　）

研究者番号：