

## 論文の内容の要旨

論文題目 A 型インフルエンザウイルスの HA 蛋白質に保存されたエピトープに結合する  
ヒトモノクローナル抗体の性状解析  
氏名 濱端 大貴

インフルエンザは、インフルエンザウイルスによって引き起こされる呼吸器感染症であり、感染すると咳などの呼吸器症状に加え、高熱、筋肉・関節痛などの全身症状が現れる。A 型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面のヘマグルチニン (HA) 蛋白質 (H1 から H18) およびノイラミニダーゼ (NA) 蛋白質 (N1 から N11) の抗原性の違いによって分類される。

現在、ヒトでは A 型インフルエンザウイルスである H1N1pdm09 亜型および H3N2 亜型のウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスが季節性の流行を続けている。現行のインフルエンザワクチンは、これら季節性インフルエンザウイルスそれぞれの HA 蛋白質に対する抗体を誘導することで感染を防御することを目的としている。HA 蛋白質は構造上、球状の Head 領域とその幹部分にあたる Stem 領域に分けられる。Head 領域の免疫原性が高いため、ワクチンによって誘導される抗体は主に Head 領域を標的とする。しかし、インフルエンザウイルスの Head 領域に存在する受容体結合部位周辺のアミノ酸は変異しやすく、それにより HA 蛋白質の抗原性が変化し、ワクチンの有効性が低下することがある。よって、流行株の抗原性とワクチン株の抗原性を一致させるために、頻繁にワクチン株を変更しなければならない。一方で、アミノ酸変異があまり起こらない Stem 領域などの高度に保存された領域を抗原とするワクチンは、様々な亜型のインフルエンザウイルスに幅広く効果があり、さらに頻繁なワクチン株の変更を必要としない「次世代型」ワクチンと成り得ると考えられている。近年、ウイルスの Head 領域に保存されたエピトープに結合するヒトモノクローナル抗体も報告されており、未だ報告のない保存されたエピトープが HA 蛋白質には存在する可能性がある。そこで本研究は、様々なヒトモノクローナル抗体から交差反応性を持つ抗体を探索し、その性状解析を行った。

H1 および H3 亜型のリコンビナント HA 蛋白質に対する 76 種類のヒトモノクローナル抗体の反応性を ELISA で調べた。その結果、11 種類のモノクローナル抗体が H1 および H3 亜型の両方の HA 蛋白質を認識した (表 1)。そこで、これらの 11 種類の抗体の中からより広範な HA 蛋白質に反応性を示すものを探索することにした。

表 1. リコンビナント HA 蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体の反応性

mAb	H1N1	H3N2				
	2009 <sup>a</sup>	1968 <sup>b</sup>	1990 <sup>c</sup>	1993 <sup>d</sup>	1994 <sup>e</sup>	1997 <sup>f</sup>
011-10069 5G01	++ <sup>g</sup>	+	-	-	++	++
011-10069 5D01	+	+	-	-	++	++
019-10117 3F01	+	-	-	+	+	++
008-10053 1G05	+	++	++	++	++	++
019-10117 3C06	+	+	++	++	++	++
019-10117 3A06	++	+	+	++	++	++
034-10040 4F02	++	++	++	++	++	++
045-051310 2B06	++	++	++	++	+	-
013 10078 3G01	+	+	-	++	++	+
DY 10065 2B03	+	++	++	++	++	++
3DR500224C 7F02	++	++	++	++	++	+
抗 Stem 抗体 <sup>h</sup>	++	+	+	+	+	+
抗 Head 抗体 <sup>i</sup>	-	-	++	++	++	++
抗 B-HA 抗体 <sup>j</sup>	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> A/California/04/2009、<sup>b</sup> A/Bilthoven/15793/68、<sup>c</sup> A/Victoria/2/90、<sup>d</sup> A/Netherlands/399/93、<sup>e</sup> A/Hong Kong/55/94、<sup>f</sup> A/Auckland/10/97

<sup>g</sup> 各抗体 (1 µg/ml) の反応性は、ELISA での OD 値をもとに ++ (>0.5)、+ (0.1-0.5) および - (<0.1) で示した。<sup>h</sup> S9-1-10/5-1、<sup>i</sup> 240-15-051 IgG1 1A06、<sup>j</sup> 1429B52/3/1-9

上記の 11 種類の抗体について、A 型インフルエンザウイルスの全 18 亜型の HA 蛋白質に対する反応性を調べるため、各 HA 蛋白質を発現させた 293T 細胞を用いて ELISA を行った。その結果、クローン 034-10040 4F02 のみが全ての亜型の HA 蛋白質に結合した。このことから、034-10040 4F02 は全ての亜型の HA 蛋白質に保存されたエピトープを認識することが分かった。そこで、この抗体について詳細な解析を行うことにした。

034-10040 4F02 が培養細胞でのウイルス増殖を阻害できるか調べるため、3 種類の H1 亜型および 16 種類の H3 亜型のウイルスに対する 034-10040 4F02 の中和活性を調べた。その結果、034-10040 4F02 は供試した H1 亜型のウイルスに対して中和活性を示さなかったが、16 種類中 7 種類の H3 亜型のウイルスに対して中和活性を示した。

034-10040 4F02 のエピトープを調べるため、エスケープ変異ウイルスを取得した。得られた 3 種類の変異ウイルス (HA-E156K、HA-278R および HA-I418V) を用いて中和試験を行ったところ、278 番目のセリンおよび 418 番目のイソロイシンにおける変異が 034-10040 4F02 からのエスケープに重要であることが分かった。得られた 2 種類のエスケープ変異について HA 蛋白質の立体構造にマッピングを行った (図 1a)。さらに、034-10040 4F02 のエピトープがどの領域であるかを確認するため、HA 蛋白質の Head 領域または Stem 領域に結合する抗体と 034-10040 4F02 との競合結合試験を行った。その結果、034-10040 4F02 は抗 Stem 抗体および抗 Head 抗体のいずれとも競合しなかった (図 1b)。このことから、034-10040 4F02 のエピトープは、Head 領域と Stem 領域の中間付近に位置することが分かった。

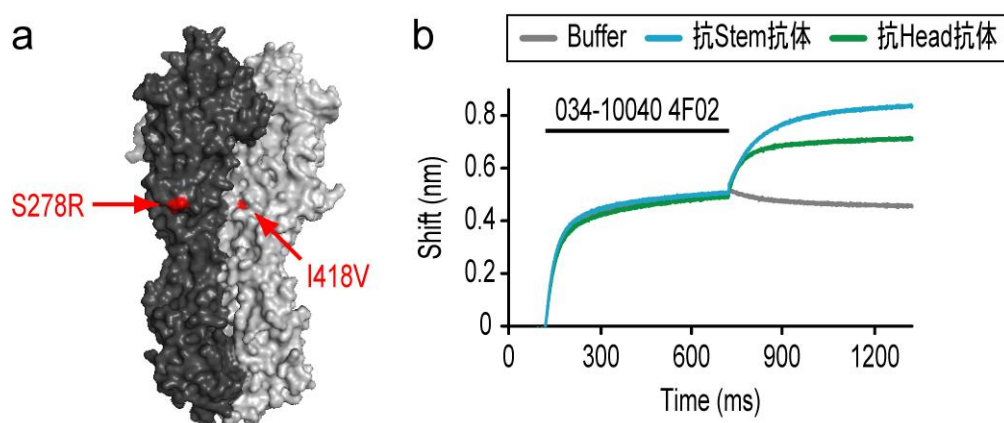


図 1. H3 亜型の HA 蛋白質における 034-10040 4F02 のエピトープ解析

(a) A/Victoria/2/90 (H3N2) を 034-10040 4F02 存在下で 2 から 3 回継代することで得られたエスケープ変異ウイルスの HA 蛋白質が獲得した変異部位を、PyMOL を用いて三量体 HA 蛋白質の 3D 構造にマッピングした。変異部位のアミノ酸番号は、H3 numbering に基づいて示した。(b) 抗体の競合結合試験。A/Victoria/2/90 (H3N2) の HA 蛋白質に 034-10040 4F02 を結合させた後、抗 Stem 抗体および抗 Head 抗体が結合するか調べた。

血球凝集阻止 (HI) 試験、プラーク減少試験、膜融合阻害試験およびウイルス放出阻害試験の結果から、034-10040 4F02 はウイルスの赤血球凝集活性および膜融合活性を阻害することで細胞への侵入を抑制し、子孫ウイルスの細胞からの放出を抑制することが分かった。また、ウイルス感染細胞の表面に輸送された HA 蛋白質に結合し、その Fc 領域を介して NK 細胞やマクロファージが活性化することで、感染細胞を破壊し、感染防御に寄与する ADCC 活性を 034-10040 4F02 が誘導するかを調べた。その結果、034-10040 4F02 は H1 および H3 亜型ウイルス感染細胞のいずれに対しても ADCC 活性を誘導することが分かった。

最期に、034-10040 4F02 がマウスに対する H1、H3、H5 および H7 亜型のウイルスの致死感染に対して感染防御能を示すか調べた。その結果、034-10040 4F02 は H1、H3、H7 および H9 亜型の各ウイルスに対して個体レベルで感染防御活性を示すことが分かった (図 2)。

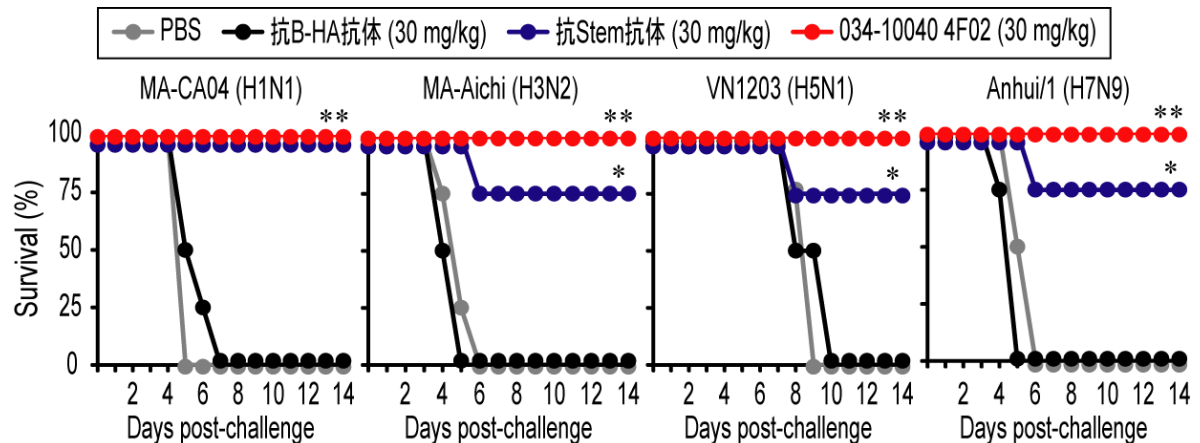


図 2. マウスにおける H1、H3、H5 および H7 亜型のウイルスに対するヒトモノクローナル抗体の感染防御活性

各群につき 4 匹のマウスを使用し、PBS、抗 B 抗体 (1429B52/3/1-9、30 mg/kg)、抗 Stem 抗体 (S9-1-10/5-1、30 mg/kg) または 034-10040 4F02 (30 mg/kg) を腹腔内投与した 1 日後に、10 MLD<sub>50</sub> の MA-CA04 (H1N1)、MA-Aichi (H3N2)、VN1203 (H5N1) あるいは Anhui/1 (H7N9) を感染させた。感染後 14 日間、生存率を毎日観察した。有意差検定は Log-rank test を行い、危険率 (P) が 5% 未満の場合に有意差ありと判定した。\*: P<0.05、\*\*: P<0.01、PBS に対する有意差。

本研究では、034-10040 4F02 が HA 蛋白質の Head 領域と Stem 領域の中間にあるエピトープに結合し、様々な亜型の A 型インフルエンザウイルスに対して感染防御活性を示すことを明らかにした。034-10040 4F02 はウイルスの赤血球凝集活性および膜融合活性を阻害することで細胞への侵入を抑制した。また、034-10040 4F02 は細胞からのウイルスの放出を抑制すること、および ADCC 活性を誘導することも明らかになった。これまでも、様々な亜型の HA 蛋白質に保存された領域として、Stem 領域、受容体結合部位、Head 領域の側面部分、Head 領域の Antigenic site E、Head 領域の 2 つのモノマーにまたがる領域が報告されている。今回同定された 034-10040 4F02 のエピトープは、過去に報告がない新たな保存領域であり、次世代型ワクチンの開発に考慮すべきエピトープである。