

## 論文の内容の要旨

論文題目: Improvements in the prevention and treatment of influenza

(インフルエンザの予防・治療を目指した研究)

氏名: 浦木 隆太

インフルエンザは、インフルエンザウイルスが引き起こす急性呼吸器感染症である。特に A 型インフルエンザウイルスは、2009 年の豚由来 A(H1N1)pandemic 2009 ウイルスのように、数十年に一度パンデミックを引き起こす。そのため、インフルエンザの予防・治療法の確立は、公衆衛生上重要な課題である。私はこれまで、i) 非増殖型インフルエンザウイルス(半生インフルエンザウイルス)を基盤とした二価ワクチンの開発、ii) ヘモゾインのアジュバントとしての有効性の検討、iii) 幅広い交叉防御効果が期待できる予防・治療法の確立について研究を行ってきた。

**【第一部】PB2 欠損半生インフルエンザウイルスを基盤とした異なる抗原性のインフルエンザウイルスに対する二価ワクチンの開発**

現在、日本ではインフルエンザに対するワクチンとして不活化ワクチンが使用されている。不活化ワクチンは安全性が高いものの、感染防御に重要な粘膜免疫を誘導することができない。そこで私の所属する研究室では、呼吸器粘膜において抗原特異的抗体を誘導できる PB2 欠損半生インフルエンザウイルスを作出し、その有効性を明らかにしてきた。本ウイルスは、PB2 を欠損させた部位に外来遺伝子を搭載することで多価ワクチンへの応用が期待できる。そこで私は PB2 欠損半生インフルエンザウイルスを基盤として、異なる抗原性のインフルエンザウイルスに対する二価ワクチンを作出した。

今回私は、A(H1N1)pandemic 2009 インフルエンザウイルスおよび高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスに着目した。PB2 欠損半生インフルエンザウイルスのバックボーンとして、H1N1 亜型である A/Puerto Rico/8/34 (PR8)株を用いた。私は、PR8 株の PB2 欠損部位に、PR8 株と抗原性の異なる H1N1 亜型である A(H1N1)pandemic 2009 インフルエンザウイルス(A/California/04/2009 株:Ca04 株)または H5N1 亜型である高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス(A/Vietnam/1203/2004 株:VN1203 株)の Hemagglutinin(HA) 遺伝子(Ca04HA、VN1203HA)を挿入した半生インフルエンザウイルス(PR8/PB2-Ca04HA ウイルス、PR8/PB2-VN1203HA ウイルス)を作出し、二価ワクチンとしての効果を検討した。作出したウイルスを BALB/c マウスに 2 週間間隔で 3 回経鼻免疫し、最終免疫から 3 週間後に血液、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液を採取し、バックボーンである PR8 株および搭載した HA に対する抗原特異的抗体の検出を試みた。その結果、免疫したマウスの呼吸器粘膜面において、抗原特異的な抗体が有意に誘導されていることが判明した。

続いて、PR8/PB2-Ca04HA ウイルスと PR8/PB2-VN1203HA ウイルスの感染防御効果について検討した。それぞれのウイルスで免疫したマウスに致死量の PR8 株を感染したところ、すべてのマウスが生残した。さらに、PR8/PB2-Ca04HA ウイルスで免疫したマウスに致死量のマウス馴化 Ca04 株を、PR8/PB2-VN1203HA ウイルスで免疫したマウスに致死量の VN1203 株を接種したところ、共にすべてのマウスが生残した。以上の結果から、PR8/PB2-Ca04HA および PR8/PB2-VN1203HA ウイルスはそれぞれ抗原性の異なる 2 つのウイルス株に対して感染防御能を有することが判明した。

## 【第二部】PB2 欠損半生インフルエンザウイルスを基盤としたインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌に対する二価ワクチンの開発

肺炎球菌は、インフルエンザ感染後の細菌性二次感染を引き起こす主要な原因菌である。現在、インフルエンザおよび肺炎球菌感染症の両方に対して同時に感染を防御する有効なワクチンは未だ開発されていない。そこで、私は、肺炎球菌の抗原を搭載した半生インフルエンザウイルスを作出し、インフルエンザ、肺炎球菌感染症、さらにインフルエンザ感染後の細菌性二次感染に対する予防効果を検討した。

私は、PB2 欠損部位に、肺炎球菌の抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA) 遺伝子を搭載した半生インフルエンザウイルスを作出した (PB2 欠損 PspA ウイルス)。C57BL/6j マウスに 2 週間間隔で PB2 欠損 PspA ウイルスを 3 回経鼻免疫したところ、PB2 欠損 PspA ウイルスで免疫したマウスの呼吸器粘膜において、抗原特異的抗体が誘導されていた。

続いて、PB2 欠損 PspA ウイルスの感染防御効果について検証した。最終免疫 2 週間後、致死量のインフルエンザウイルスまたは肺炎球菌を感染させた結果、PB2 欠損 PspA ウイルスで免疫したマウスは、致死量のインフルエンザウイルスあるいは肺炎球菌の感染を受けても 100%生残した。

最後に、二次感染マウスモデルを用いて、インフルエンザ感染後の肺炎球菌による二次感染に対する予防効果を検討した。非免疫群では 80%以上のマウスがインフルエンザ感染後の肺炎球菌による二次感染により死亡したのに対し、PB2 欠損 PspA ウイルスで免疫したマウス群は 100%生残した。従って、PB2 欠損 PspA ウイルスはインフルエンザ、肺炎球菌感染症、インフルエンザ感染後の肺炎球菌による二次感染に対して有効であることが示された。

以上の結果より、PB2 欠損半生インフルエンザウイルスは多価ワクチンの新たなプラットフォームになることが示唆された。

## 【第三部】インフルエンザワクチンに対するヘモゾインのアジュバント効果の検証

日本国内ではインフルエンザワクチンとして安全性の高い不活化ワクチンが使用されている。皮下注射で投与される本ワクチンは、免疫原性が弱いという欠点がある。近年経鼻投与によって、皮下注射より効率よく抗体応答を誘導できるという報告があるものの、免疫原性が十分とは言い難い。免疫原性を増強する方法の一つとして、アジュバントを添加する方法がある。今回、私は新規アジュバント候補であるヘモゾイン(マラリア原虫のヘモグロビン代謝産物)のアジュバント効果についてインフルエンザ感染マウスモデルを用いて検証した。

ヘモゾインのアジュバント効果を検討するために、PBS、ヘモゾイン、ホルマリン不活化 Ca04、またはヘモゾインを添加したホルマリン不活化 Ca04 をそれぞれ 2 週間隔で 2 回 BALB/c マウスに経鼻投与し、免疫を行った。最終免疫 3 週後に血清、肺胞洗浄液および鼻腔洗浄液におけるウイルス特異的抗体価を検出した。また、最終免疫 3 週後に致死量のマウス馴化 Ca04 株を感染させ、マウスの生存を観察した。

その結果、不活化ウイルスのみで免疫した群と比較し、ヘモゾインを添加した不活化ウイルスで免疫した群では、血清中のウイルス特異的 IgG が有意に高く誘導されていた。致死量のマウス馴化 Ca04 株を感染させたところ、PBS 接種群ではすべてのマウスが死亡したが、ヘモゾイン単独接種群および不活化ウイルスのみで免疫した群では 25%のマウスが生残した。一方、ヘモゾインを添加した不活化ウイルスで免疫した群は、すべてのマウスが生残した。これらの結果から、ヘ

モゾインはインフルエンザワクチンのアジュバントとして有効であることが示された。

#### 【第四部】幅広い交叉反応性を示すヒトモノクローナル抗インフルエンザウイルス抗体の作出

HA は構造上、球状部領域と幹領域の 2 つに分けられる。球状部領域には、インフルエンザウイルスが標的細胞と結合するための必要なレセプター結合部位が存在する。一方、幹領域はウイルス膜と標的細胞膜の膜融合に必要な部位が存在する。世界中で広く使用されているインフルエンザワクチンによって誘導される抗体の多くは HA の球状部領域に対する抗体である。A 型インフルエンザウイルスの幹領域は高度に保存されているため、幹領域に対する抗体は様々な亜型のインフルエンザウイルス感染に対して感染防御効果を示すと期待される。そこで私は、様々な亜型に対して交叉反応性を示す抗 HA 抗体を得るために H5N1 プレパンデミックワクチンを接種したボランティアから回収したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いてヒトモノクローナル抗体の作出を試みた。

私は、PBMC およびヒトリンパ球融合パートナー細胞である SYPMEG 細胞を融合させ、ハイブリドーマを作出した。その後、H1HA、H3HA、H5HA、H7HA および B 型 HA を抗原として用いた ELISA 法にて目的のハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行った。

その結果、得られたクローンの多くは H5HA 特異的抗体であったが、H1HA および H5HA に反応する抗体 1 種類、H1HA、H5HA および H7HA に反応する抗体 1 種類、H3HA および H5HA に反応する抗体 1 種類、H1HA、H3HA、H5HA および H7HA に反応する抗体 2 種類を得ることができた。これらの抗体は異なる亜型に対して交叉反応を示すことから、パンデミック発生時の新たな予防・治療薬となる可能性が考えられる。

#### 【第五部】幅広い交叉防御効果を示すことが期待されるインフルエンザウイルス抗原の作出

第四部において、私は様々な亜型に対して交叉反応性を示すヒトモノクローナル抗体の作出を行ったが、そのような抗体を強く誘導できるワクチンは季節性のインフルエンザウイルスのみならず、予測の難しいパンデミックウイルスに対しても感染防御効果を示すことが期待される。そこで私は、哺乳類細胞において、分泌型 HA 幹領域蛋白質を作出することを試みた。

HA は感染細胞内でトリプシン様プロテアーゼによって HA1 および HA2 に切断される。HA1 の一部と HA2 が HA 幹領域として機能しているため、私は、分泌型 HA 幹領域として HA1 のアミノ酸 11 番目-52 番目、277 番目-321 番目、HA2 の 1 番目-165 番目を用いた。さらに、HA 幹領域蛋白質を哺乳類細胞で分泌させるために、N 末端に HA の分泌シグナルペプチドを付加した。また、分泌効率を上昇させるために、3 量体形成ドメインであるフィブリチンドメインを付加したコンストラクトも作出した。

その結果、HA2 のアミノ酸 1 番目-165 番目を N 末側に配置し、続いて HA1 の 11 番目-52 番目、277 番目-321 番目を融合させた蛋白質が哺乳類細胞培養上清中に分泌することが判明し、さらに C 末端にフィブリチンドメインを付加することによって、大幅に分泌効率が上昇することが明らかとなった。また、この幹領域蛋白質は、第四部で作出した H1HA、H3HA、H5HA および H7HA に反応するヒトモノクローナル抗体にも認識された。これらの結果から、作出した HA 幹領域蛋白質は HA 幹領域に対する抗体を効率よく誘導できる可能性が考えられる。

以上のように、私は新規ワクチンやアジュバントに着目して研究を行ってきた。これらの研究成果はインフルエンザに対する予防・治療法の確立に貢献すると期待される。