



Title	RSウイルスワクチン開発に向けたpreF特異的抗体を誘導可能なF蛋白質の創製
Author(s)	伊藤, 莉麻
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101460
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (伊 藤 莉 麻)

論文題名 RSウイルスワクチン開発に向けたpreF特異的抗体を誘導可能なF蛋白質の創製

論文内容の要旨

第1章 序論 呼吸器合胞体ウイルス (RSV) は上気道及び下気道感染症の主な原因ウイルスであり、ヒトは生後2歳までにほぼ100%がRSVに初感染し、その後も生涯にわたって感染を繰り返す。早産児や2歳未満の幼児、心肺疾患や免疫不全などの疾患を有する者、高齢者は、細気管支炎や肺炎といった重篤な下気道感染症へ進展する危険性が高く、疾病負荷の高い感染症である。本邦においても今後のパンデミックに備えるべき重点感染症として選定され、安全性と有効性の高いRSVワクチンの開発が望まれている。有望なワクチン標的として考えられているFusion glycoprotein (F蛋白質) はエネルギー的に準安定な融合前構造 (preF) と安定な融合後構造 (postF) の2つの形態があり、その構造変化は不可逆的である。RSV感染防御にはpreF固有の抗原部位であるsite Ø及びsite Vに結合する抗体が重要であると考えられており、postFに結合する抗体は著しく中和活性が低いか、もしくは非中和抗体であり、抗体依存性感染増強を惹起するリスクがある。以上の背景から、本博士論文では安全性と有効性の高いRSVワクチンの開発を目指して、強力なウイルス中和活性を示すpreF特異的抗原部位site Ø及びsite Vを安定的に保存し、高い割合でpreF特異的結合抗体を誘導可能なF蛋白質の創製を試みた。

第2章 preF特異的抗原部位の安定化及びF蛋白質発現量向上に有用なアミノ酸残基置換の探索 強力な中和活性エпитープである抗原部位site Ø及びsite Vを安定的に保存するF蛋白質の創製を目指して、(1) システイン残基への置換による新規ジスルフィド結合の導入、(2) 第2フーリン切断部位及びp27のアミノ酸残基置換、(3) 疎水性アミノ酸残基への置換による二次構造ドメインの安定化、(4) 計算解析を用いたpreFの不安定性因子及び安定化アミノ酸残基置換の探索、(5) 主要なRSV株のアミノ酸配列アライメントからの有用なアミノ酸残基置換の探索を行った。アミノ酸残基置換を導入したF蛋白質変異体は哺乳類細胞を用いて作製し、site Ø及びsite V結合抗体に対する結合性とF蛋白質の発現量を確認することで、アミノ酸残基置換の有用性を評価した。結果として、(1) で見出したL141C及びL373Cにより、site Ø結合抗体に対する結合性が向上し、(2) で見出したR135N及びR136Nによってsite V結合抗体に対する結合性が向上した。さらに、(3) で見出したT189V及びS190VではF蛋白質の発現量が向上した。(4) ではAsp194とGlu60の静電反発がpreFの不安定性に寄与している可能性が示され、E60M、E60F、E60Lによってエネルギー的に安定した状態になり、site Ø及びsite V結合抗体に対する結合性が向上した。(5) においては、F蛋白質の発現量向上効果があるK42R及びV384Tを見出した。これらのアミノ酸残基置換を組み合わせることでsite Ø及びsite Vを安定的に保存するF蛋白質を創製できると考えた。

第3章 アミノ酸残基置換を組み合わせたF蛋白質変異体の有用性評価 第2章で見出したアミノ酸残基置換を組み合わせた4つのF蛋白質変異体を作製し、ワクチン抗原としての有用性評価を行った。F蛋白質変異体は強い中和活性を有する6種類のpreF特異的抗体に結合し、site Ø及びsite V上のエпитープを広く保存していることが確認された。これらのエпитープは4℃で30日間の保管及び凍結融解後においても保存されていた。また、F蛋白質変異体の特徴として、ヒトにおいて抗体誘導能を持つことが示されているpreF安定化抗原DS-Cav1と比べて、中和活性が著しく低い抗postF抗体に対する結合性が低いことが示された。ヒトの血清検体を用いて、自然感染によってヒトで産生された中和抗体または非中和抗体のエпитープについても保存しているか評価したところ、F蛋白質変異体は中和抗体のエпитープを広く保存しており、DS-Cav1と比べて、抗postF抗体のエпитープを有していないことを示す結果が得られた。さらに、F蛋白質変異体をマウスに免疫すると、血清中にpreF特異的抗体が高い割合で誘導され、生体内においてもpreF特異的抗原部位を安定して保存しており、preF特異的抗体を誘導可能な抗原であることが示された。

第4章 総括 本博士論文では、安全性と有効性の高いRSVワクチンの開発を目指して、preF特異的抗原部位site Ø及びsite Vのエпитープの安定性を向上させるアミノ酸残基置換と、哺乳類細胞におけるF蛋白質発現量を向上させるアミノ酸残基置換を複数見出し、それらを組み合わせることでsite Ø及びsite Vを含む中和活性エпитープを広く保存し、高い割合でpreF特異的結合抗体を誘導可能な4つのF蛋白質変異体を創製した。抗postF抗体に対する結合性の低さから、抗体依存性感染増強を惹起するリスクの低い安全性と有効性の優れたワクチン抗原となることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (伊藤 莉麻)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	栗栖 源嗣
論文審査の結果の要旨			
<p>本論文では、RS ウイルスワクチン開発に向けた preF 特異的抗体を誘導可能な F 蛋白質の創製に関する研究を行っており、以下の4章から構成されている。</p> <p>第 1 章「序論」においては、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) が上気道及び下気道感染症の主な原因ウイルスであり、疾病負荷の高い感染症であり、重点感染症として選定され、安全性と有効性の高い RSV ワクチンの開発が望まれていることを述べ、有望なワクチン標的として考えられている Fusion glycoprotein (F 蛋白質) はエネルギー的に準安定な融合前構造 (preF) と安定な融合後構造 (postF) の 2 つの形態があり、その構造変化は不可逆的であること、ならびに、RSV 感染防御には preF 固有の抗原部位である site Ø 及び site V に結合する抗体が重要であると考えられており、postF に結合する抗体は著しく中和活性が低いか、もしくは非中和抗体であり、抗体依存性感染増強を惹起するリスクがあり、安全性と有効性の高い RSV ワクチンの開発を目指すためには、強力なウイルス中和活性を示す preF 特異的抗原部位 site Ø 及び site V を安定的に保存し、高い割合で preF 特異的結合抗体を誘導可能な F 蛋白質の創製が課題であることが述べられている。</p> <p>第 2 章「preF 特異的抗原部位の安定化及び F 蛋白質発現量向上に有用なアミノ酸残基置換の探索」においては、強力な中和活性エピトープである抗原部位 site Ø 及び site V を安定的に保存する F 蛋白質の創製を目指して、(1) システイン残基への置換による新規ジスルフィド結合の導入、(2) 第 2 フーリン切断部位及び p27 のアミノ酸残基置換、(3) 疎水性アミノ酸残基への置換による二次構造ドメインの安定化、(4) 計算解析を用いた preF の不安定性因子及び安定化アミノ酸残基置換の探索、(5) 主要な RSV 株のアミノ酸配列アライメントからの有用なアミノ酸残基置換の探索を行っている。アミノ酸残基置換を導入した F 蛋白質変異体は哺乳類細胞を用いて作製し、site Ø 及び site V 結合抗体に対する結合性と F 蛋白質の発現量を確認することで、アミノ酸残基置換の有用性を評価し、結果として、(1) で見出した L141C 及び L373C により、site Ø 結合抗体に対する結合性が向上し、(2) で見出した R135N 及び R136N によって site V 結合抗体に対する結合性が向上すること、さらに、(3) で見出した T189V 及び S190V では F 蛋白質の発現量が向上すること、(4) では Asp194 と Glu60 の静電反発が preF の不安定性に寄与している可能性が示され、E60M、E60F、E60L によってエネルギー的に安定した状態になり、site Ø 及び site V 結合抗体に対する結合性が向上すること、(5) においては、F 蛋白質の発現量向上効果がある K42R 及び V384T を見出している。これらのアミノ酸残基置換を組合わせて site Ø 及び site V を安定的に保存する F 蛋白質を創製可能であると述べられている。</p> <p>第 3 章「アミノ酸残基置換を組み合わせた F 蛋白質変異体の有用性評価」においては、第 2 章で見出したアミノ酸残基置換を組み合わせた 4 つの F 蛋白質変異体を作製し、ワクチン抗原としての有用性評価を行っており、F 蛋白質変異体は強い中和活性を有する 6 種類の preF 特異的抗体に結合し、site Ø 及び site V 上のエピトープを広く保存していることが確認されている。また、F 蛋白質変異体の特徴として、ヒトにおいて抗体誘導能を持つことが示されている preF 安定化抗原 DS-Cav1 と比べて、中和活性が著しく低い抗 postF 抗体に対する結合性が低いことが示されている。ヒトの血清検体を用いて、自然感染によってヒトで産生された中和抗体または非中和抗体のエピトープについても保存しているか評価し、F 蛋白質変異体は中和抗体のエピトープを広く保存しており、DS-Cav1 と比べて、抗 postF 抗体のエピトープを有していないことを示す結果が得られている。さらに、F 蛋白質変異体をマウスに免疫すると、血清中に preF 特異的抗体が高い割合で誘導され、生体内においても preF 特異的抗原部位を安定して保存しており、preF 特異的抗体を誘導可能な抗原であることも示されている。</p> <p>第 4 章「総括」においては、RS ウイルスワクチン開発に向けた preF 特異的抗体を誘導可能な F 蛋白質の創製に関して総括している。以上のように、本論文は RS ウイルスワクチン開発に向けた F 蛋白質の創製により RS ウイルスワクチン開発にむけた新しい成果を得ている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			