



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	<a href="https://doi.org/10.18910/101460">https://doi.org/10.18910/101460</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 博士学位論文

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

伊藤 莉麻

2024 年 10 月

大阪大学大学院工学研究科  
生物工学専攻 生物工学コース

# 目次

第1章 序論 .....	1
第1節 研究背景 .....	1
RSV 感染症について .....	1
RSV の構造及び RSV 感染を制御する標的因子 .....	2
F 蛋白質について .....	3
preF 及び postF の抗原部位 .....	5
RSV ワクチン開発 .....	6
第2節 博士論文構成 .....	8
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 .....	10
第1節 緒言 .....	10
第2節 実験材料および方法 .....	13
(1) F 蛋白質の作製 .....	13
(2) 評価用抗体の作製 .....	14
(3) 構造認識抗体を用いたエピトープの保存性評価 .....	14
(4) preF 構造の計算解析 .....	15
(5) 主要な RSV 株のアミノ酸配列アライメントからのアミノ酸残基置換抽出 .....	15
(6) 細胞培養上清中の RSV-F 蛋白質質濃度の測定 .....	15
第3節 結果及び考察 .....	17
システイン残基置換による新規ジスルフィド結合の導入 .....	17
第2フーリン切断部位及び p27 のアミノ酸残基置換 .....	18
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 .....	21
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 .....	24
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抽出 .....	28
第4節 小括 .....	32
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 .....	34
第1節 緒言 .....	34
第2節 実験材料および方法 .....	36
(1) F 蛋白質の作製 .....	36
(2) 評価用抗体の作製 .....	36
(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 .....	36
(4) 動的光散乱法による粒子径測定 .....	37
(5) 構造認識抗体を用いたエピトープの保存性評価 .....	37
(6) マウス免疫血清の取得 .....	37

(7) ヒト血清およびマウス免疫血清中の抗 F 抗体の吸着.....	38
(8) ヒト血清中の抗 postF 抗体価の測定.....	38
(9) マウス免疫血清中の抗 preF 抗体価測定 .....	39
(10) ウイルス中和活性評価.....	39
第 3 節 結果および考察.....	41
F 蛋白質変異体 FH_50, FH_81, FH_82, FH_85 の作製及び性状確認 .....	41
構造認識抗体を用いた preF 特異的エピトープの保存性評価.....	44
ヒトで誘導される中和抗体及び非中和抗体のエピトープ保存性評価 .....	46
preF 特異的抗体誘導能の評価 .....	49
第 4 節 小括 .....	50
第 4 章 総括 .....	52
本論文に関する発表論文.....	55
その他 発表論文 .....	55
引用文献 .....	56

## 第1章 序論

### 第1節 研究背景

#### RSV 感染症について

呼吸器合胞体ウイルス (Respiratory syncytial virus, 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、世界中に広く分布している。生後 2 歳までにはほぼ 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<sup>1,2</sup>。一般的には 4-6 日の潜伏期間を経て、発熱や鼻汁、咳などの上気道症状を呈し、数日のうちに回復することが多い。しかし、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有する者、高齢者においては、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いことが報告されており<sup>3,4</sup>、世界全体で RSV に関連する死亡者数は 2019 年ではおよそ 34 万人に上る<sup>5</sup>。RSV 感染症は特に 5 歳未満の幼児にとって健康被害が深刻であり、2019 年では世界全体で RSV による下気道感染症に推定 3300 万人が罹患し、360 万人が入院、RSV に起因する死者は 10 万人と推定されている<sup>6</sup>。さらに、RSV による下気道感染により、その後の喘息及びアレルギー疾患の発症リスクが増大し、長期的な合併症を引き起こす可能性が高いことが報告されている<sup>7,8</sup>。現在、RSV 感染症の治療薬は無く、対処療法が基本となっている。国内外で RSV 感染症の重症化抑制を目的とした抗体薬 Palivizumab と Nirsevimab が承認されているが、投与対象は重症化リスクを有する乳幼児と非常に限定期である。本邦において RSV 感染症による入院患者の平均医療費は、5 歳以下の幼児で約 JPY 370,000、Palivizumab の平均累積費用は約 JPY 890,000 であることが調査の結果から示されており<sup>9,10</sup>、疾病負荷の高い感染症である。世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は RSV の予防・治療薬の開発を重要課題の一つとして位置付けており<sup>11</sup>、本邦においても 2014 年に開発優先度の高いワクチンとして RSV ワクチンが指定されている<sup>12</sup>。さらに、2021 年にはワクチン開発・

生産体制強化戦略における重点感染症として開発を支援すべきワクチンとして選定され<sup>13</sup>, RSV ワクチンの開発が望まれている。

### RSV の構造及び RSV 感染を制御する標的因子

RSV は *Pneumovirus* 科 *Orthopneumovirus* 属に分類されるエンベロープを有するマイナス一本鎖 RNA ウィルスである。ウィルスゲノムは約 15,200 塩基長であり、11 種類の蛋白質 (NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2, L) をコードする 10 個の遺伝子が含まれている<sup>14</sup> (図 1)。RSV は G 遺伝子の塩基配列を基盤とした分子系統解析により A 型と B 型の 2 つのサブグループに分類される。ウィルス粒子表面には Attachment glycoprotein (G 蛋白質), Fusion glycoprotein (F 蛋白質), Small hydrophobic protein (SH 蛋白質) が存在し、G 蛋白質は宿主細胞表面分子と相互作用してウィルス粒子を標的の宿主細胞に結合させる付着蛋白質として機能する<sup>14,15</sup>。F 蛋白質も付着活性を有するが、主な機能はウィルスと宿主細胞膜の融合を仲介することである<sup>16</sup>。G 蛋白質が宿主細胞表面分子と相互作用した後、F 蛋白質に構造変化が起こり、ウィルスのエンベロープが宿主細胞膜に融合し、ウィルスが宿主細胞内に侵入する。SH 蛋白質は出芽フィラメントに十分な量で組み込まれず、ウィルスの侵入には不要であると考えられている<sup>17,18</sup>。RSV ワクチンや RSV 感染症治療薬の標的として、主にウィルスの宿主細胞内への侵入において重要な役割を果たす G 蛋白質と F 蛋白質が着目されているが、G 蛋白質は 11 種類の蛋白質の中で最も高頻度でアミノ酸変異が生じ、2 つのサブグループ間のアミノ酸配列同一性は 53%と低いため<sup>19,20</sup>、アミノ酸配列の保存性が高い F 蛋白質がより有望な標的であると考えられている<sup>21</sup>。

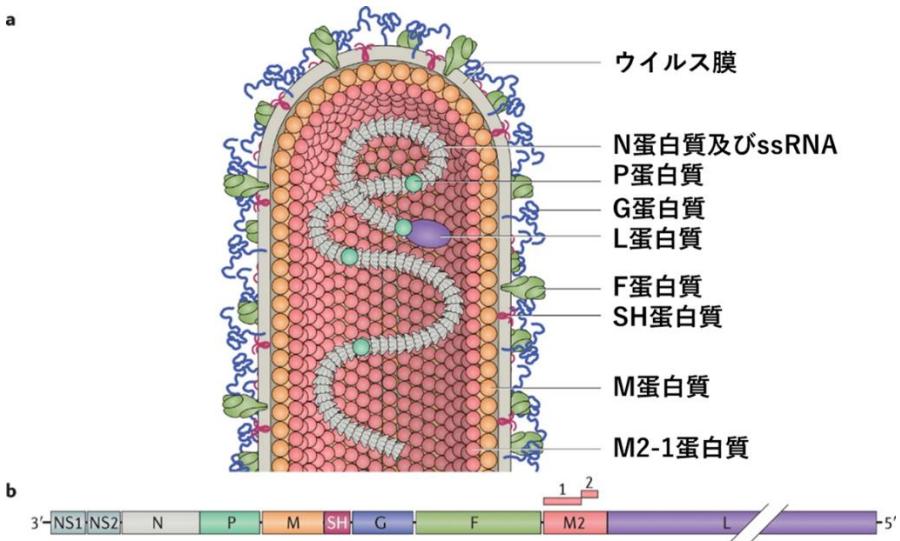


図 1 RSV 粒子の糸状形態と RSV ゲノム (一部改変<sup>14</sup>)

### F蛋白質について

RSV の F 蛋白質はクラス I の膜融合蛋白質であり, 配列の類似性は限られているものの, *Paramyxovirus* 科のウイルスの膜融合蛋白質と構造的に類似している<sup>22,23</sup>. F 蛋白質は小胞体内のシグナルペプチダーゼによって除去される NH<sub>2</sub> 末端シグナルペプチド (SP) と, COOH 末端付近の細胞質ドメイン (CP) を含む 574 個のアミノ酸残基の前駆体蛋白質 (F0) として合成される (図 2A). F0 は宿主細胞由来プロテアーゼであるフーリンによって, 27 個のアミノ酸残基 (p27) で隔てられた 2 つのフーリン切断部位 (FCS) で切断され, F2 (NH<sub>2</sub> 末端側) と F1 (COOH 末端側) のサブユニットが生成される<sup>24</sup>. F2 サブユニットはヘプタッドリピート配列 HRC で構成され, F1 サブユニットは融合ペプチド (FP), ヘプタッドリピート配列 HRA, ドメイン I, ドメイン II, ヘプタッドリピート配列 HRB, 膜貫通ドメイン (TM), CP から構成される. F2 サブユニットと F1 サブユニットは 2 つのジスルフィド結合を介して共有結合し, ヘテロ二量体プロトマーを形成する. 3 つのプロトマーは共有結合し, ウィルスと感染細胞の表面に存在する成熟したホモ三量体を形成すると考えられている<sup>25</sup>. 三量体 F 蛋白質はロリポップ型の融合前構造 (preF) に折り畳まれており, 一連のダイナミ

ックな構造変化を経て、松葉杖型の融合後構造 (postF) をとる (図 2B). クラス I の膜融合蛋白質はこの不可逆的な構造変化により、膜融合を媒介すると考えられている<sup>26,27</sup>. preF は中心に埋もれている FP の後に 4 つの短い HRA  $\alpha$ -ヘリックスが続く。ウイルス粒子が標的細胞に付着する等の何らかのきっかけにより、HRA がリフォールディングし、一つの長い HRA  $\alpha$ -ヘリックスが形成され、preF 蛋白質の内部に埋もれていた FP が露出して、標的細胞に挿入される。この HRA  $\alpha$ -ヘリックスはコイルドコイル三量体を形成し、HRB  $\alpha$ -ヘリックスと結合することで安定した 6 ヘリックスバンドル (6-HB) を形成し、ウイルス膜と細胞膜を近接させて膜融合が起こる<sup>15,25</sup> (図 2C). preF から postF への構造変化のきっかけは明らかになっていないが、ウイルス粒子表面及び溶液中において、準安定な preF はエネルギー的に安定な postF に容易に構造変化をすることが報告されている<sup>28-31</sup>.

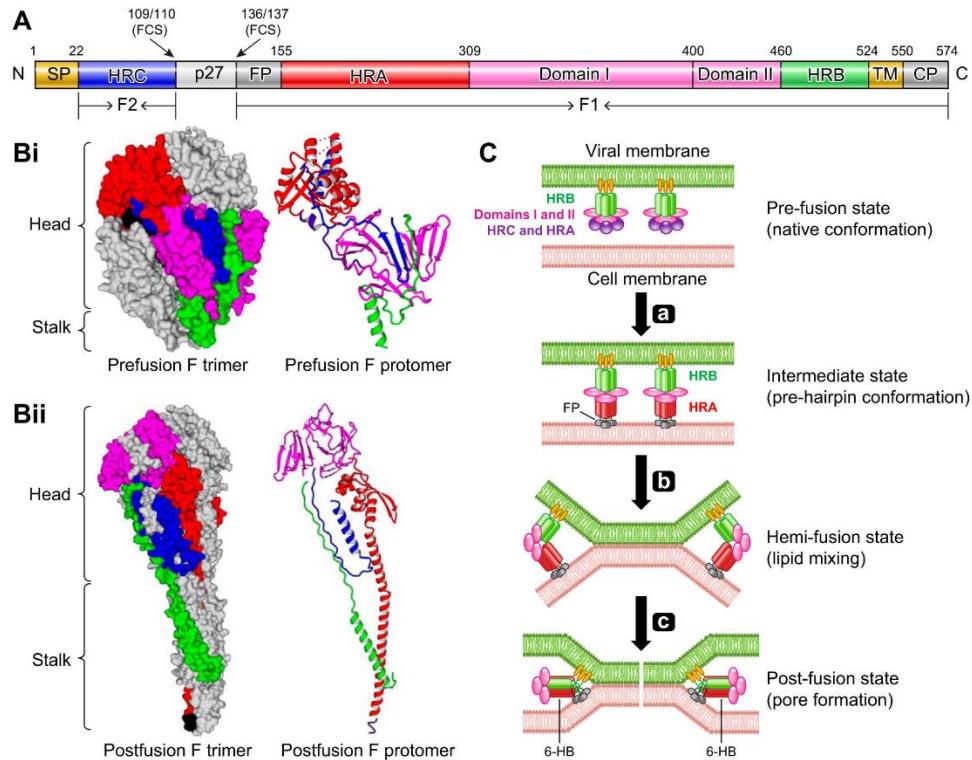


図 2 F 蛋白質の主要ドメインと preF/postF 構造及び膜融合時の構造変化<sup>25</sup>

### **preF 及び postF の抗原部位**

preF 及び postF には抗原部位と呼ばれる 6 つのエピトープのグループ (site Ø, I, II, III, IV, 及び V) が特定されている (図 3). site Ø 及び V は preF 固有の抗原部位であり, site Ø 及び site V に結合する抗体は非常に強力なウイルス中和活性を持つことが知られている<sup>32,33</sup>. site III は二次構造要素は preF と postF の両方に存在するが, postF では異なる空間配置をとっているため, site III に結合する抗体は preF に強く結合することが知られている<sup>34</sup>. site III に結合する抗体は site Ø 及び V 結合抗体に次いで, 強いウイルス中和活性を持つことが報告されている<sup>35</sup>. site II 及び IV は preF と postF の両方に存在する抗原部位である. site II 及び IV に結合する抗体は site Ø 結合抗体の 1/10–100 以下のウイルス中和活性であることが報告されている<sup>36,37</sup>. RSV 感染症の重症化リスクを有する乳幼児に対して重症化の抑制を目的として使用が認められている Palivizumab は site II に, Nirsevimab は site Ø に結合する抗体であり, Palivizumab の中和活性は Nirsevimab の 1/150 程度であることが報告されている<sup>38</sup>. site I は postF 蛋白質に存在する抗原部位であり, site I に結合する抗体はウイルス中和活性が非常に弱いか, または非中和抗体であると報告されている<sup>39</sup>. 複数の研究グループにより, 健康な成人において RSV への自然感染によって誘導されるウイルス中和抗体の大部分が preF に結合する抗体であることが報告されており, RSV 感染防御においては preF 特異的抗原部位である site Ø 及び site V に結合する抗体が重要であることが示されている<sup>40,41</sup>.

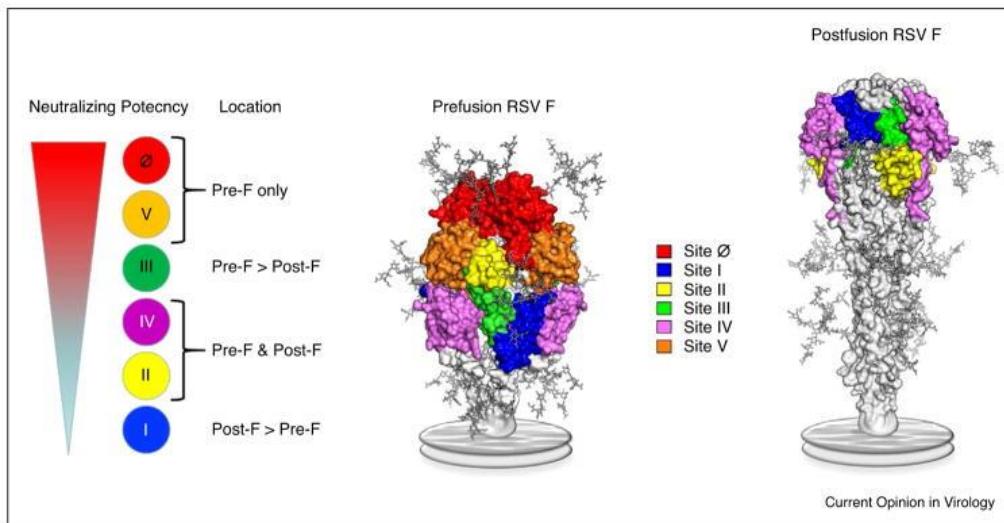


図 3 preF 及び postF の抗原部位とウイルス中和活性<sup>42</sup>

### RSV ワクチン開発

RSV 感染症に関する最初のワクチンは 1960 年代に開発されたホルマリン不活化ワクチンである。米国にて乳幼児を対象とした臨床試験が行われたが、ワクチン接種群において接種後の RSV 初感染時の入院率が 80% と非接種群と比べて非常に高く、2 名が死亡する事例が発生し、開発は中止となった<sup>43, 44</sup>。その後の研究で、モデル動物及び RSV 疾患の増強を呈した小児の死後肺切片から、ワクチン接種後の RSV 感染時において、肺における抗体抗原複合体の沈着と補体活性化が起こることが確認された<sup>45, 46</sup>。また、ホルマリン不活化ワクチンでは F 蛋白質に対する高い抗体価は確認できたが、中和抗体価は自然感染よりも低いことが明らかとなった。ホルマリン不活化処理により、ウイルス表面の F 蛋白質が preF から postF へ構造変化し、非中和抗体が高い割合で誘導されたことが原因の一つとして考えられている<sup>47, 48</sup>。このような非中和抗体及び中和活性の低い抗体に起因する抗体依存性疾患増強 (Antibody-Dependent Enhancement, ADE) は小児を対象とした麻疹ウイルスワクチンやデングウイルスワクチンにおいても報告されている<sup>49-51</sup>。

ホルマリン不活化ワクチンの臨床試験結果により、RSV ワクチンの開発は停滞していたが、待望の RSV ワクチンは 2023 年に上市された。2024 年 4 月時点での国内で上市されている RSV ワクチンは Arexvy (GlaxoSmithKline 社) と Abrysvo (Pfizer 社) の 2 製品である。いずれも preF 蛋白質をベースとする組換えサブユニットワクチンであり、60 歳以上の方に適応となっている。しかし、臨床試験結果から、ワクチン接種により非中和抗体が誘導されることで中和抗体の比率が低下することや、2 回目接種後の中和抗体価が減弱することが推定され、再接種時の効果については改善の余地があると考えられる<sup>52-54</sup>。また、Arexvy 及び Abrysvo は妊婦を接種対象とする母子免疫ワクチンとしても臨床試験が実施されたが、早産や妊婦高血圧症、低出生体重児、新生児黄疸の発生リスクが高かったことが報告されており<sup>55,56</sup>、Arexvy については第 III 相試験を早期に中止とした。Abrysvo については安全性に有意差はないということで妊婦にも適用されたが、接種を受けた妊婦及び出生児への安全性についてはモニタリングしていく必要があると考える。一方で、乳幼児や小児を適応とした RSV ワクチンについては未だ上市されているワクチンはない。以上を踏まえると、RSV 感染症には未だアンメットメディカルニーズが存在し、安全性と有効性の高い RSV ワクチンの開発は依然として重要な課題である。

## 第 2 節 博士論文構成

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。本博士論文の構成は下記の通りである。

第 2 章では、準安定である preF にのみ存在する抗原部位 site Ø 及び site V の保存性向上させる為、立体構造の観察および計算解析、RSV 株のアライメント解析によってアミノ酸残基置換を設計した。設計し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、preF 特異的結合抗体に対する結合性及び F 蛋白質発現量を指標として、アミノ酸残基置換の有用性を評価した。

第 3 章では、第 2 章で見出したアミノ酸残基置換を組合わせた 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を評価した。比較対照として、配列情報や結晶構造、各種動物種での中和抗体誘導能が確認されており、ヒトにおいて上市品と同等の抗体誘導能を持つ preF 安定化抗原 DS-Cav1 を用いた<sup>57,58</sup>。エピトープが公知である複数の preF 特異的結合抗体との結合評価を行い、site Ø 及び site V 上のエピトープを広く保存していることを確認した。さらに、健常成人の血清を用いて、実際にヒトが自然感染によって誘導する中和抗体または非中和抗体のエピトープを保存しているか評価した。最後に、F 蛋白質変異体をマウスに免疫し、preF 特異的抗体の誘導を確認することで、生体内における preF 特異的エピトープの安定性及び preF 特異的抗体誘導能を評価した。

第 4 章では、第 3 章までの研究内容をまとめると共に本学位論文の結論を示し、今後の研究の展望を述べた。

本博士論文の構成を図 4 に示した。

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蛋白質を創製する

【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】

- 立体構造の観察および計算解析、RSV株のアライメント解析によってアミノ酸残基置換を設計
- preF特異的結合抗体に対する結合性及びF蛋白質発現量を指標として、アミノ酸残基置換の有用性を評価

【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】

- 有用なアミノ酸残基置換を組み合わせたF蛋白質変異体を作製
- preF特異的結合抗体のエピトープ、ヒト血清中の中和抗体・非中和抗体のエピトープの保存性を評価
- 生体内におけるpreF特異的エピトープの保存性及びpreF特異的抗体誘導能の評価

▼  
安全性と有効性の高いRSVワクチン抗原を創製することで  
RSV感染による呼吸器疾患の重症化から人々を保護する事に貢献する

図 4 本学位論文の構成

## 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

### 第1節 緒言

安全性と有効性の高いRSVワクチンを開発するにあたり、強力な中和活性を示すpreF特異的抗原部位に結合する抗体を高い割合で誘導できるワクチン抗原を創製する必要がある。preFは準安定であり、エネルギー的に安定なpostFへ容易にかつ不可逆的な構造変化を起こすことが報告されている<sup>28-31</sup>。preF特異的抗原部位であり、強力な中和活性エピトープであるsiteØ及びsiteVはこの構造変化によって消失する。postFへの構造変化を起こす生理学的トリガーは明らかとなっていないが、F蛋白質の発現培養及び精製工程、熱処理や凍結融解、4°Cまたは37°Cでの一定期間の保管などによっても構造変化を起こすことが報告されている<sup>29,30,57,59,60</sup>。本章ではpreF特異的抗原部位であるsiteØ及びsiteVを安定的に保存するF蛋白質の創製を目指して、下記の5つのアプローチでアミノ酸残基置換を設計し、有用性を評価した。

1つ目のアプローチとして、新たにジスルフィド結合を形成させるためのシステイン残基置換を試みた。siteØを含む137–216位のアミノ酸残基はpreFからpostFへの構造変化で二次構造が大きく変化する領域であるため、137–216位のアミノ酸残基と隣接する構造変化が生じない領域のアミノ酸残基のペアをシステイン残基に置換し、ジスルフィド結合で固定化することで137–216位の構造変化を抑制し、siteØを安定化できると考えた。

2つ目のアプローチとして、p27(110–136位のアミノ酸残基)に着目した。2000年にCalderらによってF蛋白質がpreFとpostFの2つの異なる構造をとることが発見されて以降<sup>61</sup>、X線結晶構造解析や構造モデリングなどによりF蛋白質の構造に対する理解が深まった。しかし、p27の構造及び生物学的役割は依然として不明のままである。F蛋白質はF0として合成された後、宿主細胞内のフーリンによって2ヶ所(106–109位の第1フーリン切断部位

RARR $\downarrow$ , 及び 131–136 位の第 2 フーリン切断部位 KKRKRR $\downarrow$ ) の切断が起き, F2 と F1 のサブユニットが形成されると考えられており, 感染細胞表面やウイルス表面には p27 を含む F 蛋白質は存在しないと考えられてきた<sup>24,62</sup>. その一方で, より近年の研究ではウイルス表面に p27 を含む F 蛋白質が存在し, 標的細胞への感染過程で第 2 フーリン切断部位の切断が生じ, FP が露出することで宿主細胞との膜融合が起こるという報告もある<sup>63</sup>. 本研究では第 2 フーリン切断部位のアミノ酸残基置換によってフーリン切断を阻害する事で postF への構造変化が抑制され, preF 特異的抗原部位を安定化できると考えた. また, Krarup らによって p27 が preF の三量体形成を抑制または不安定化するというモデルが提唱されていことから<sup>59</sup>, 第 2 フーリン切断部位のアミノ酸残基置換に加えて, p27 をアミノ酸残基置換した変異体を設計し, 三量体 preF の形成についても評価した.

3 つ目のアプローチとして, 二次構造の変化が大きな 176–194 位の逆平行 β-シートに着目した. 二次構造を不安定にする可能性があるアミノ酸残基を中心に周辺構造を観察したところ, 189 位のスレオニン残基と 190 位のセリン残基は親水性アミノ酸であり, この 2 つのアミノ酸残基の近位には 57 位のイソロイシン残基, 167 位のイソロイシン残基, 171 位のロイシン残基, 179 位のバリン残基, 260 位のロイシン残基と疎水性アミノ酸が存在しており, 二次構造の安定性を損ねている可能性が考えられた. そこで, 189 位と 190 位を疎水性アミノ酸残基に置換することで構造を安定化させることを試みた.

4 つ目のアプローチとして, preF の野生型モデル構造を用いた計算解析を行い, アミノ酸配列や蛋白質構造の観察からは容易に推測できない preF の不安定性因子の探索及びアミノ酸残基置換による解消を試みた. PDB データの温度因子から原子の揺らぎが大きい領域を特定し, 領域周辺のアミノ酸残基間の相互作用エネルギー解析を行うことで preF の不安定性に寄与している可能性が高いアミノ酸残基を特定した. アミノ酸残基置換による構造安定化効果はエネルギー計算と実験的検証の双方から確認した.

蛋白質の機能改変や機能解析において、ターゲットの遺伝子上に無作為に変異を導入する方法や、アミノ酸残基を網羅的に置換する方法が利用されているが、これらは多大な時間と労力を要する。特に哺乳類細胞での発現が必要な F 蛋白質では、これらの方針を用いた網羅的な有用アミノ酸残基置換の探索は現実的な手段ではない。RSV は G 蛋白質ほど高頻度ではないが F 蛋白質においてもアミノ酸残基置換が発生することが報告されている<sup>64</sup>。ヒトへの感染が確認されているウイルス単離株において見られる F 蛋白質のアミノ酸残基置換は、F 蛋白質の構造及び機能を維持する上で許容できる変異であり、確度高く有用なアミノ酸残基置換を見出すことができると考えた。そこで、5つ目のアプローチとして、ヒトへの感染が確認されている主要なウイルス株のアミノ酸配列のアライメントからアミノ酸残基置換を抽出し、評価することで、有用なアミノ酸残基置換を効率的に特定できると考えた。

上記アプローチより設計したアミノ酸残基置換を導入した F 蛋白質変異体を哺乳類細胞を用いて作製した。site Ø 及び site V の安定化に対するアミノ酸残基置換の有用性は強いウイルス中和活性を有し、site Ø に結合する抗体 D25<sup>32</sup> 及び三量体 preF の site V に結合する抗体 AM14<sup>36,65</sup> に対する結合性を指標として評価した。また、ワクチンとして実用化を目指す上で、安全性や有効性はもとより、製造可能性についても考慮して研究初期から分子設計を行うことが重要である。そこで、本章の研究では F 蛋白質の発現量についても有用性の指標として用いた。

## 第2節 実験材料および方法

### (1) F蛋白質の作製

本研究で作製する F 蛋白質のアミノ酸配列は、F 蛋白質発現量を増強する効果があるとして RSV ワクチンに関する先行研究において使用されている 3 つの天然変異 (P102A, I379V, M447V)<sup>32,66</sup> を導入した RSV A2 株の F 蛋白質 (UniProt ID: P03420) の細胞外ドメイン (1-513 位のアミノ酸残基) に由来する。COOH 末端には T4 バクテリアファージ由来の三量体化ドメインである Foldon, Thrombin 認識配列, His-Tag 及び Strep-Tag II を付加した。上記の F 蛋白質をコードするポリヌクレオチドは pcDNA3.4-TOPO (Thermo Fisher Scientific) に組み込み、F 蛋白質を発現する哺乳類細胞用発現プラスミドを構築した。Expi293 Expression System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Expi293F 細胞へ発現プラスミドを導入し、5 日間の一過性発現を行った。発現期間終了後、培養液を遠心分離し、0.22 μm フィルターを用いて濾過することで、培養上清を回収した。培養上清中の F 蛋白質は Ni Sepharose High Performance resin (Cytiva) を用いて精製した。培養上清は結合バッファー (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7.4) で希釈し、Ni 担体と一昼夜反応させた。反応後、溶出バッファー (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4) を用いて Ni 担体から F 蛋白質を溶出させた。その後、限外濾過膜を用いて溶媒を PBS (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 155 mM NaCl, 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific) に置換した。F 蛋白質の発現量は精製後の F 蛋白質溶液の 280 nm における吸光度  $A_{280}$ 、アミノ酸一次配列情報から推定されるモル吸光度係数  $\varepsilon$  と分子量  $M$ 、精製後の F 蛋白質溶液量  $V_p$  (mL)、発現培養液量  $V_c$  (L) を用いて発現培養体積当たりの発現量  $y$  (mg/L-culture) を算出した (式(1))。

$$y = A_{280} \times \frac{M}{\varepsilon} \times \frac{V_p}{V_c} \quad \text{式 (1)}$$

## (2) 評価用抗体の作製

抗 RSV-F 抗体 D25 (PDB ID: 4JHW), AM14 (PDB ID: 7MPG) の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドはそれぞれ pcDNA3.4-TOPO に組み込み, 哺乳類細胞用発現プラスミドを構築した. Expi293 Expression System を用いて, Expi293F 細胞へ発現プラスミドを導入し, 5 日間の一過性発現を行った. 発現期間終了後, 培養液を遠心分離し, 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを用いて濾過することで, 培養上清を回収した. HiTrap MabSelect SuRe (Cytiva) を用いて培養上清から抗体を精製し, 限外濾過膜を用いて溶媒を PBS に置換した.

## (3) 構造認識抗体を用いたエピトープの保存性評価

Octet QK384 system (Sartorius) を用いて F 蛋白質と Palivizumab (AstraZeneca), D25, AM14 の結合を測定し, エピトープの保存性を評価した. 測定は 1000 rpm, 25°C で行い, サンプルの調製, センサーチップの平衡化及び洗浄は PBS を用いた. Protein A センサーチップ (Sartorius) と各抗体溶液 (200 nM) を 180 秒間反応させ, 抗体を固相化させた. センサーチップを洗浄した後, F 蛋白質 (200 nM) と 180 秒間反応させ, F 蛋白質と抗体の相互作用解析を行った. Octet 解析ソフトウェアを用いて R equilibrium 値を算出し, 各抗体に対する結合レスポンスとした. 各抗体に対する結合レスポンスは F 蛋白質の構造変化によらず preF と postF の両方に結合可能な Palivizumab に対する結合レスポンスとの比を求めてことで, 正規化した. 本評価系は複数回測定を行った際の CV 値 (変動係数) が平均 10%未満と測定値のバラつきが小さいことから, スクリーニング段階である第 2 章では F 蛋白質サンプル当たりの評価数は 1 とした.

#### (4) preF 構造の計算解析

PDB に登録されている三量体 preF 構造 (4MMS) を初期構造として使用した。Protein Preparation Wizard<sup>67</sup> (Schrödinger) を用いて導入されているアミノ酸変異を元のアミノ酸残基に置換し (F190S, L207V), 計算に使用する preF の野生型モデル構造を作成した。温度因子 (B factor) は 4MMS ファイルに記載されている値を用いて、残基単位での比較ができるよう主鎖の 4 原子の平均値を算出した。モデル構造内の 137–216 位の周辺残基間の静電相互作用エネルギーの計算は Prime<sup>68</sup> (Schrödinger release 2017-4) を用いて実行した。静電相互作用エネルギーの計算には静電相互作用、水和、水素結合のエネルギー値を使用した。F 蛋白質の 60 位のグルタミン酸残基を他のアミノ酸残基に置換した場合の構造安定性への影響の予測は BioLuminate (Schrödinger release 2017-4) に実装されている Residue scanning calculation<sup>69</sup> を使用し、アスパラギン酸残基とシステイン残基を除いた 17 種の他のアミノ酸残基に変異させ、変異体と野生型 (変異前) の間のギブス自由エネルギーの差を計算した。

#### (5) 主要な RSV 株のアミノ酸配列アライメントからのアミノ酸残基置換抽出

A2 株 (GenBank ID: X02221) と主要な RSV 株 Long (GenBank ID: FJ614815), 18537 (GenBank ID: JX198143), 14617 (GenBank ID: AF013254), 9320 株 (GenBank ID: AY353550) の F 蛋白質アミノ酸配列を比較し、A2 株とは異なるアミノ酸残基置換を抽出した。ウイルス中和に重要なエピトープ及び preF 構造の保持に重要なアミノ酸残基については除外した。

#### (6) 細胞培養上清中の RSV-F 蛋白質濃度の測定

Octet QK384 system を用いて細胞培養上清中の F 蛋白質濃度を測定した。測定は 1,000 rpm, 25°C で行い、サンプルの調製、センサーチップの平衡化及び洗浄は PBS を用いた。Protein A センサーチップに Palivizumab (200 nM) を 180 秒間反応させ、固相化させた。続いて、濃度既知の本研究で見出した F 蛋白質変異体 FH\_50 (L141C, L373C, R135N, R136N, T189V,

S190V) を PBS で段階希釈し、180 秒間反応させて得られた結合曲線をもとに検量線を作成した。濃度未知の培養上清サンプルは上記と同じ条件で測定し、検量線に当てはめて F 蛋白質濃度を算出した。

### 第3節 結果及び考察

#### システイン残基置換による新規ジスルフィド結合の導入

preF から postF への構造変化で二次構造が大きく変化する 137–216 位のアミノ酸残基と、隣接する構造変化が生じない領域のアミノ酸残基をそれぞれ 1 箇所ずつシステイン残基に置換し、新たにジスルフィド結合を導入することで preF 特異的抗原部位の安定化を試みた。構造の歪みや凝集形成のリスクを考慮し、システイン残基置換部位は 2 次構造をとっておらず、2 箇所のアミノ酸残基をシステイン残基に置換したときの S 原子間の距離が 5Å 未満となるように置換部位を決定した（表 1）。置換するアミノ酸残基はいずれも非極性側鎖のアミノ酸であるロイシンであることから、システイン残基置換によって水素結合などの極性基間相互作用が失われることに起因する構造不安定化のリスクは低いと考えられた。システイン残基置換を導入した F 蛋白質変異体を作製し、site Ø に結合する抗体 D25 に対する結合を確認した。アミノ酸残基置換前の F 蛋白質 (F-WT) では結合レスポンスは 0.08 であり、D25 に対する明確な結合は確認できなかった。一方で、システイン残基置換を導入した F 蛋白質変異体 FH\_08 では 0.76、FH\_09 では 0.80 であり、D25 に対する結合性の向上が確認された（図 5）。この結果から、141 位及び 373 位のロイシン残基または 142 位及び 373 位のロイシン残基をシステイン残基に置換することにより、site Ø の保存性を向上することが可能であることを示唆された。

表 1 作製した F 蛋白質変異体

F 蛋白質変異体	アミノ酸残基置換	S 原子間距離 (Å)
F-WT	なし	—
FH_08	L141C, L373C	4.35
FH_09	L142C, L373C	4.72

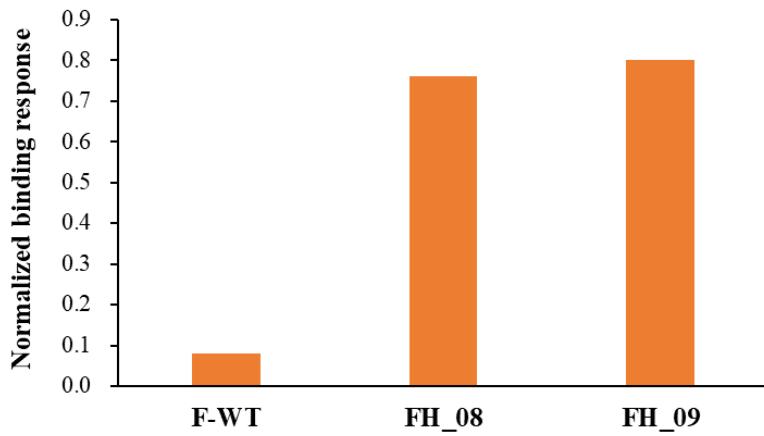


図 5 D25 に対する結合レスポンス

## 第 2 フーリン切断部位及び p27 のアミノ酸残基置換

第 2 フーリン切断部位での切断及び p27 が preF 特異的抗原部位の安定化及び preF 三量体形成に及ぼす影響を評価するため, FH\_08 及び FH\_09 の第 2 フーリン切断部位に切断を阻害するアミノ酸残基置換を導入した F 蛋白質変異体 FH\_21, FH\_22 を作製した (図 6). また, FH\_08 の p27 を長さの異なる GS リンカーで置換した F 蛋白質変異体 FH\_23, FH\_24, FH\_25 を作製した. D25 に対する結合性を確認したところ, FH\_21 の結合レスポンスは 1.02 であった (図 7). 三量体 preF の site V に結合する抗体 AM14 に対する結合性については, F-WT, FH\_09 FH\_22 では結合が確認できなかった. 一方で, FH\_08 では 0.19, FH\_08 にアミノ酸残基置換を導入した FH\_21, FH\_24, FH\_25 では 0.64, 0.36, 0.47 と結合レスポンスの向上が確認された (図 8). FH\_21 は p27 を GS リンカーで置換した FH\_24 及び FH\_25 よりも AM14 に対する結合レスポンスが高く, 最も高い結合性の向上を示した. 以上の結果から, 三量体 preF の形成または安定性を考慮すると 142 位及び 373 位のシステイン残基への置換よりも 141 位及び 373 位のシステイン残基への置換の方が preF 特異的抗原部位の安定化に有用であること, さらに, 第 2 フーリン切断部位の切断阻害及び p27 が site Ø の保存性を維持したこと

まま三量体 preF の形成または安定性を向上させる効果があることが示唆された. Rezende らによる最近の研究において, RSV 粒子上及び RSV 感染細胞上の F 蛋白質において, p27 を保持する preF は温度ストレスに対する安定性が高く, p27 が preF の構造安定性に寄与している可能性があることが示されており<sup>70</sup>, preF の構造安定性及び F 蛋白質の構造変化における p27 の役割については研究の余地があると考える.

現在上市されている preF 蛋白質をベースとする組換えサブユニットワクチンの承認申請資料によると, 製造工程において第 2 フーリン切断部位で切断されていない preF を一部含む三量体 preF が生成されることが記載されている<sup>71</sup>. このことから, 哺乳類細胞を用いて p27 を完全に除去した均一な三量体 preF を作製する為には, F 蛋白質生産細胞株の構築や培養工程において, 発現宿主細胞内のフーリンによって 2ヶ所のフーリン切断部位で完全に切断されるように F 蛋白質の発現量を制御することや, 精製工程においてイオン交換クロマトグラフィーによって p27 未切断体を分離する方法などが考えられるが, 製造コストを考慮した場合, 目的物質である均一な F 蛋白質の高い発現量と高い収量を実現するため, フーリンの共発現やアミノ酸残基置換によってフーリン切断効率を上げる等の対応が必要であると考えられる. 以上を踏まえると, 本研究で見出した第 2 フーリン切断部位のアミノ酸残基置換による切断阻害は三量体 preF の形成または安定性に対する効果に加えて, 製造工程において p27 に由来する類縁物質の生成リスクを抑えることが出来るという点においても大きな利点があると考える.

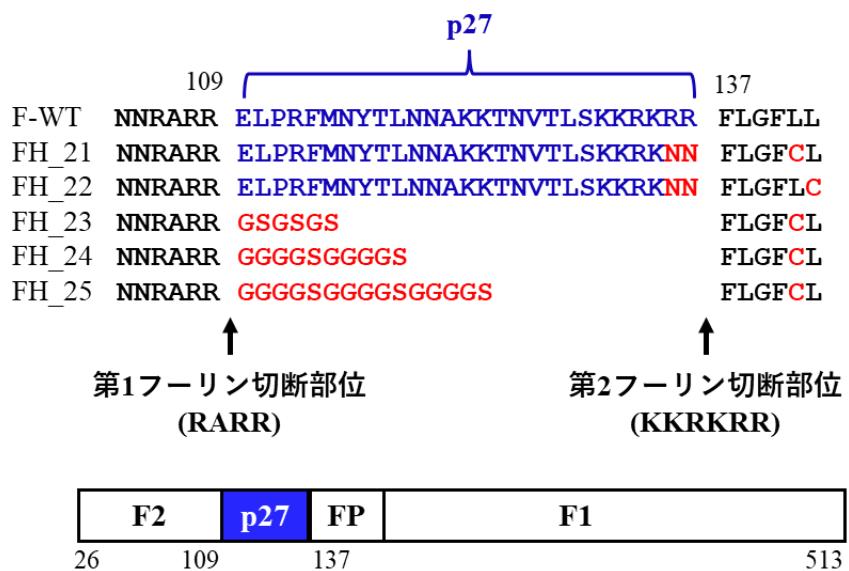


図 6 p27 及び第 2 フーリン切断部位のアミノ酸残基置換

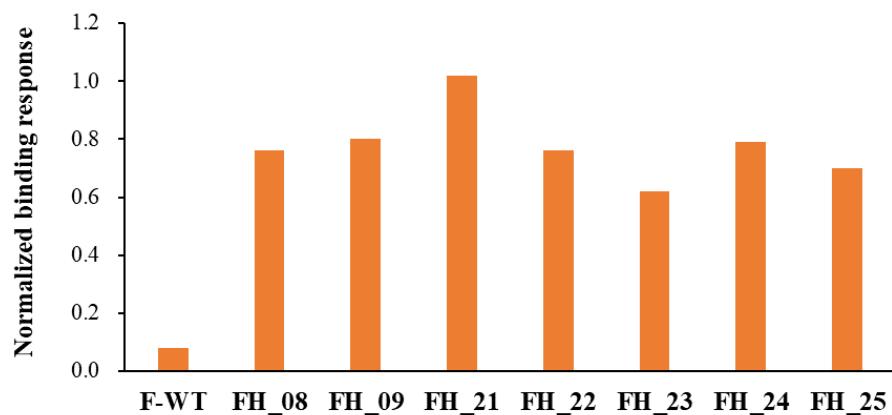


図 7 D25 に対する結合レスポンス

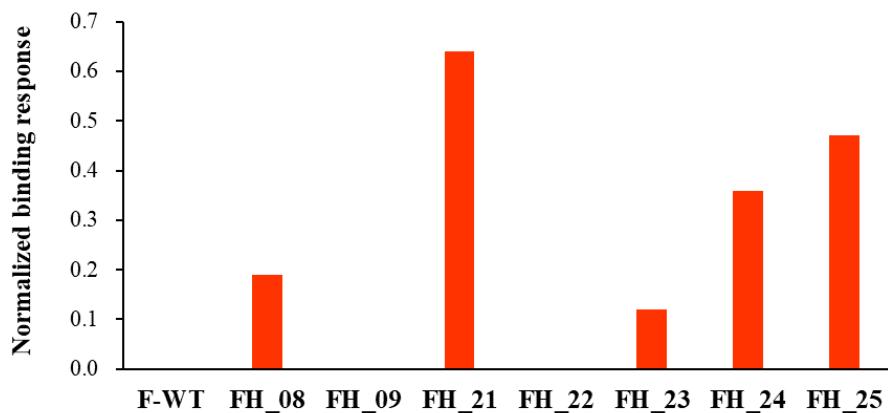


図 8 AM14 に対する結合レスポンス

#### 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

二次構造の変化が大きな 176–194 位の逆平行  $\beta$ -シートを安定化させるため, F 蛋白質変異体 FH\_21 の 189 位のスレオニン残基と 190 位のセリン残基を疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作製した (表 2, 図 9). 1L 培養あたりの F 蛋白質収量は FH\_21 と比べて, いずれの変異体においても収量が向上し, FH\_50 では 7.2 mg であった (図 10). D25 及び AM14 に対する結合性については, いずれも大きな変化はなかった (図 11, 12). 以上の結果より, 189 位及び 190 位の疎水性アミノ酸残基への置換は site  $\emptyset$  の保存性と三量体 preF の形成または安定性を維持したまま, F 蛋白質の発現量を向上させる効果があることが示唆された. 疎水性アミノ酸残基への置換により, 189 位及び 190 位の疎水性側鎖が近傍の疎水性ポケットに結合し, 疎水性相互作用によって二次構造ドメインが安定化することが考えられる.

表 2 作製した F 蛋白質変異体

F 蛋白質変異体	アミノ酸残基置換
FH_50	FH_21 + T189V, S190V
FH_51	FH_21 + T189L, S190V
FH_52	FH_21 + T189I, S190V
FH_53	FH_21 + T189V
FH_55	FH_21 + T189I

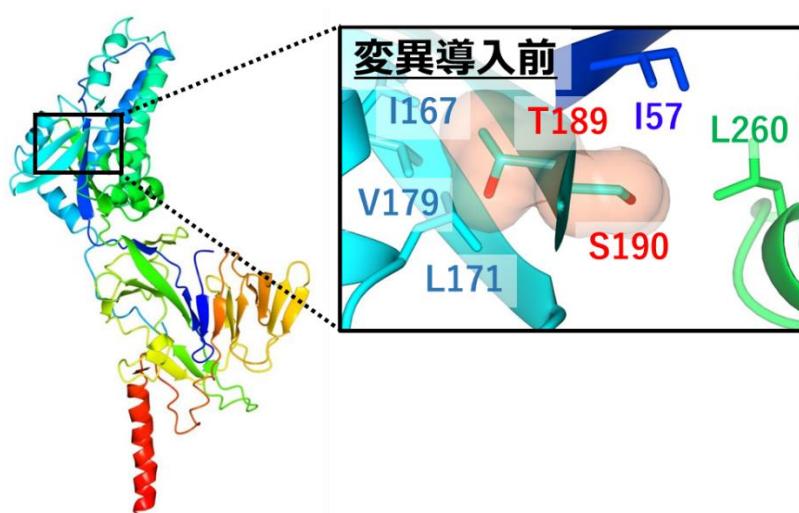


図 9 単量体 preF 構造 (PDB: 4JHW) と 189 位及び 190 位周辺の拡大図

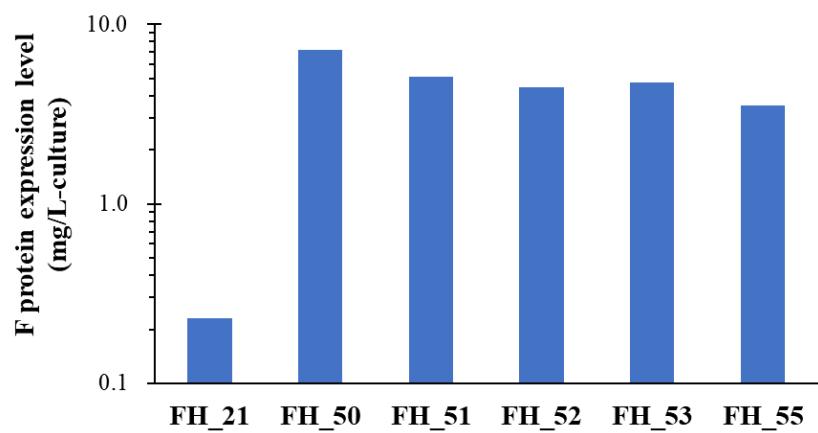


図 10 1L 培養あたりの F 蛋白質発現量

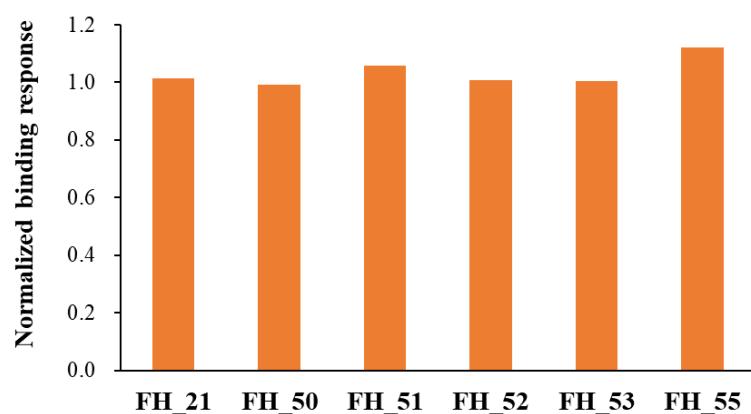


図 11 D25 に対する結合レスポンス

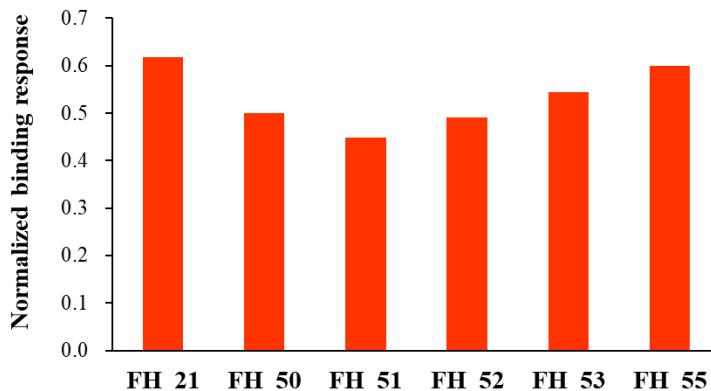


図 12 AM14 に対する結合レスポンス

### 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

アミノ酸配列や蛋白質構造の観察からは容易に推測できない preF の不安定性因子を探索するため、4MMS の結晶構造における温度因子を確認した。その結果、site Ø を含み、preF から postF への構造変化で二次構造が大きく変化する 137–216 位はその他の領域と比べて温度因子が高く、結晶構造において原子の揺らぎが大きいことが観察された（図 13）。137–216 位には荷電アミノ酸残基が複数存在していたため、4MMS を元に作成した preF の野生型モデル構造を用いて、137–216 位と周辺のアミノ酸残基の静電相互作用エネルギーを計算解析したところ、いくつかの静電相互作用が確認された（図 14）。アミノ酸残基間の静電相互作用はタンパク質の構造不安定性を引き起こす要因の一つであることが知られており<sup>72</sup>、preF の構造の不安定性に静電相互作用が寄与している可能性が考えられた。そこで、137–216 位の荷電アミノ酸残基に着目し、隣接するアミノ酸残基との静電相互作用エネルギーを確認した。194 位のアスパラギン酸残基の近くに 60 位のグルタミン酸残基が存在しており、側鎖の酸素原子間の最短距離は 3.5 Å であったことから、194 位のアスパラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基間で静電反発が生じている可能性が考えられた。実際、194 位のアスパ

ラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基間の静電相互作用エネルギーは+5.7 kcal/mol であり, 周辺アミノ酸残基と比べると大きなエネルギーを持っており, 194 位のアスパラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基間で強い静電反発が生じていることが示された (図 14, 15). 200 位のアスパラギン酸残基と 295 位のグルタミン酸残基においても側鎖の酸素原子間の最短距離が 4.9 Å であり, 静電相互作用エネルギーが+2.8 kcal/mol であることから (図 14), 静電反発が起きている可能性が考えられたが, 本研究ではより高い静電相互作用エネルギーを持つ 194 位のアスパラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基間の静電反発を抑制することを優先して研究を進めた. 免疫原性の影響を考慮し, preF の内部に位置する 60 位のグルタミン酸残基のアミノ酸残基置換を検討した. 60 位のグルタミン酸残基を他の残基に置換した場合のギブス自由エネルギー変化を計算した結果, アルギニン残基, メチオニン残基, フェニルアラニン残基, またはロイシン残基に置換することで, -13.2, -10.4, -8.9, または-7.1 kcal/mol のギブス自由エネルギー変化を示し, エネルギー的に安定した状態になることが示された (図 16). この結果について実験的に検証するため, F-WT の 60 位を非酸性アミノ酸残基に置換した Glu60 変異体を作製した結果, メチオニン残基, フェニルアラニン残基, ロイシン残基に置換した変異体において, D25 及び AM14 に対する結合性の向上が確認された (図 17, 18). これらの結果から, 194 位のアスパラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基の静電反発が preF の構造不安定性に影響を与える因子の一つであり, 60 位をメチオニン残基, フェニルアラニン残基, ロイシン残基に置換することで静電反発が抑制され, site Ø の保存性と三量体 preF の形成または安定性が向上することが示唆された.

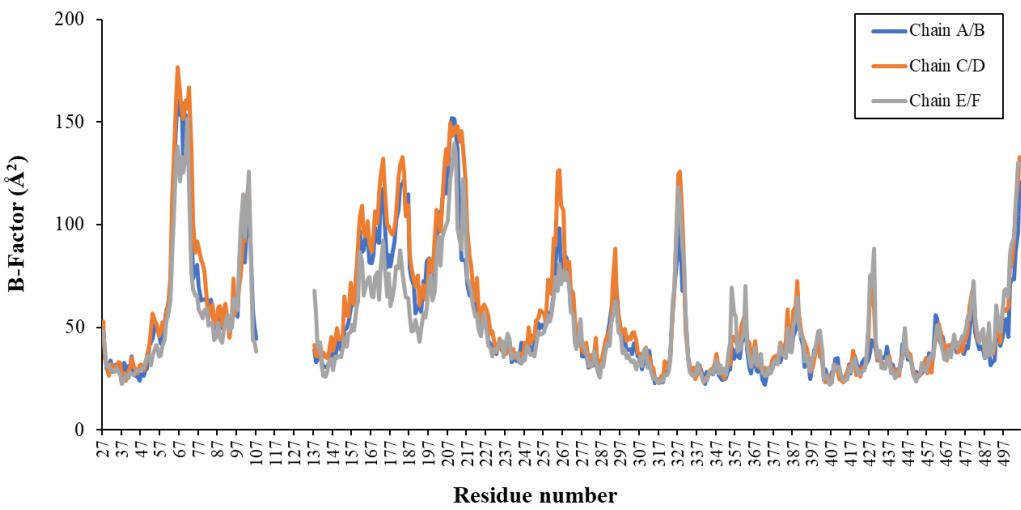
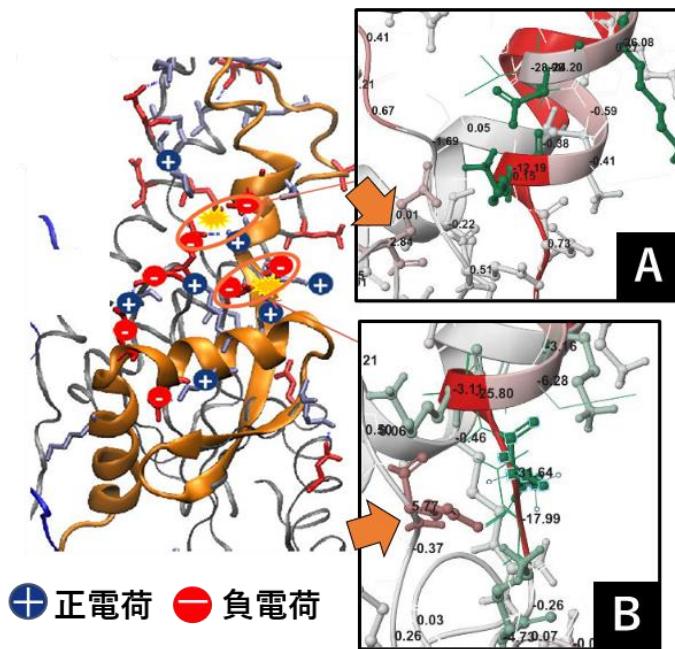


図 13 preF 構造の B-factor



A は 200 位のアスパラギン酸残基と近傍残基間の静電相互作用エネルギーを示し、矢印は 295 位のグルタミン酸残基を示す。B は 194 位のアスパラギン酸残基と近傍残基間の静電相互作用エネルギーを示し、矢印は 60 位のグルタミン酸残基を示す。

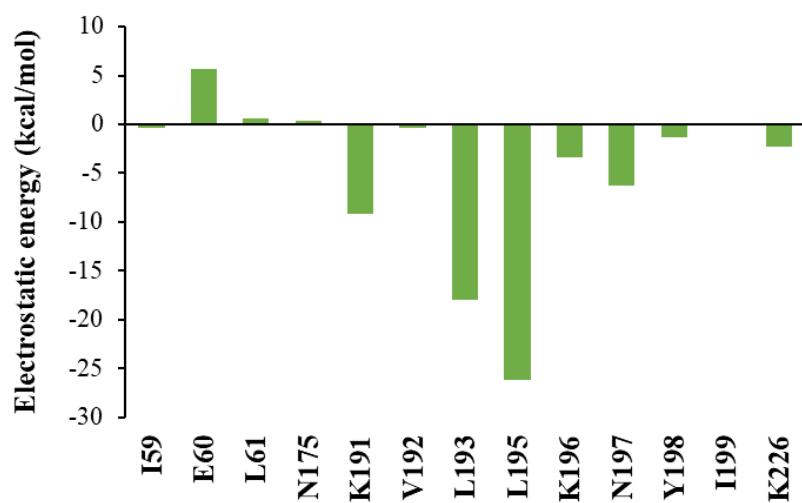


図 15 194 位のアスパラギン酸残基と近傍残基間の静電相互作用エネルギー

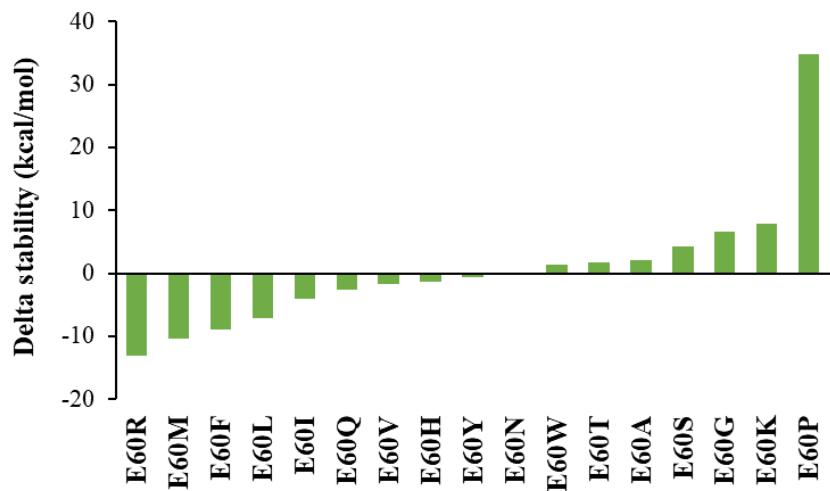


図 16 Glu60 変異体と野生型 (変異前) のギブス自由エネルギーの差

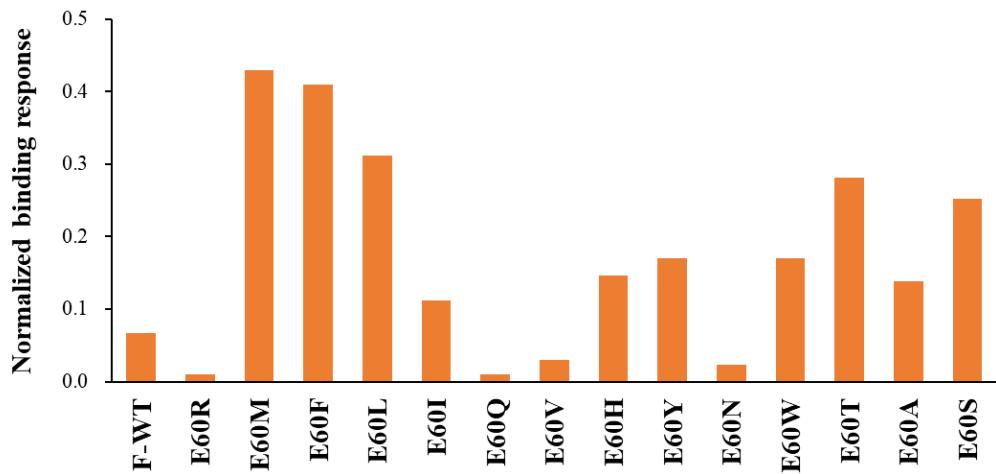


図 17 D25 に対する結合レスポンス

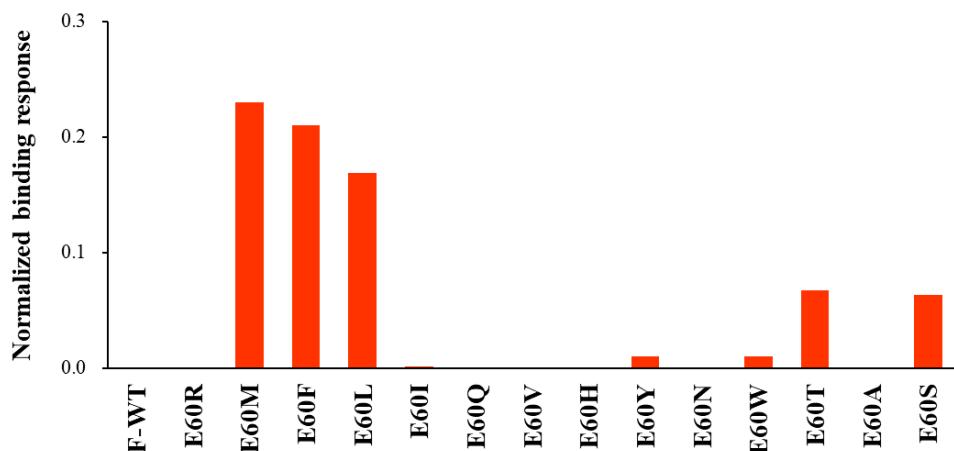


図 18 AM14 に対する結合レスポンス

### 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抽出

本研究で使用している A2 株のアミノ酸配列とヒトへの感染が確認されている主要な RSV 株である Long 株, 18537 株, 14617 株, 9320 株の F 蛋白質のアミノ酸の配列アライメントを作成した。A2 株とは一致せず、構造の安定性や中和活性エピトープに寄与しないアミ

ノ酸残基置換を 18 種類抽出した。抽出したアミノ酸残基置換は FH\_50 に導入し、96 well プレートでの小スケール培養を実施した。FH\_50 と比べて、F 蛋白質変異体 NH21 (アミノ酸残基置換 : K42R) および NH36 (アミノ酸残基置換 : V384T) において培養上清中の F 蛋白質濃度の向上が確認された (図 19)。培養上清を用いて D25 及び AM14 に対する結合を確認した結果、結合性が向上した変異体はなく、NH21 及び NH36 は FH\_50 と同等の結合性を示した (図 20, 21)。K42R 及び V384T を FH\_50 に共導入したところ、1Lあたりの F 蛋白質発現量は 36.2 mg に向上した (図 22)。以上の結果より、K42R 及び V384T は site Ø の保存性と三量体 preF の形成または安定性を維持したまま、F 蛋白質の発現量を向上させる効果があることが示唆された。さらに、これら 2 つのアミノ酸残基置換を共導入することで F 蛋白質の発現量をさらに向上させる効果があることが示された。

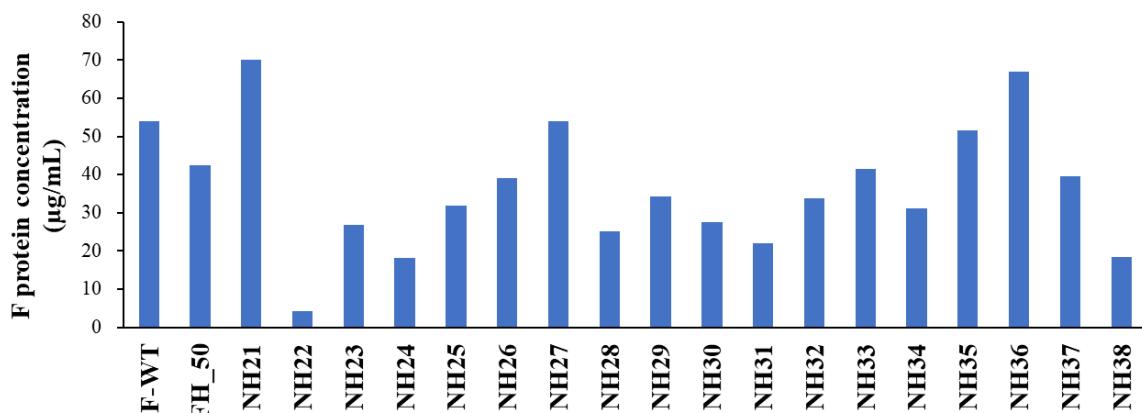


図 19 培養上清中の F 蛋白質濃度

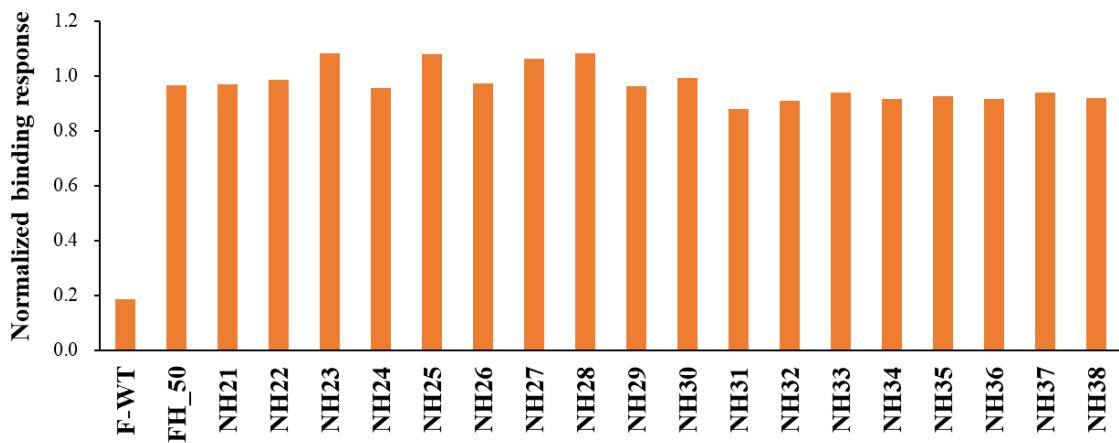


図 20 D25 に対する結合レスポンス

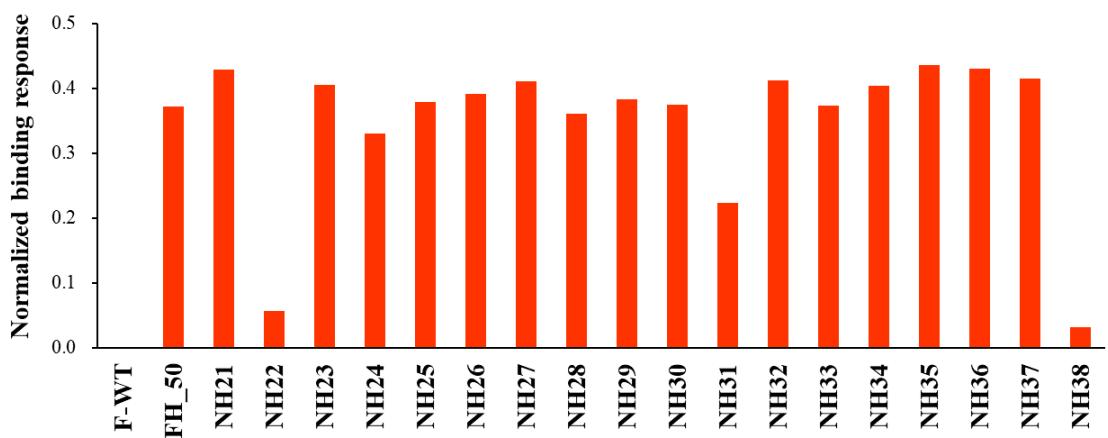


図 21 AM14 に対する結合レスポンス

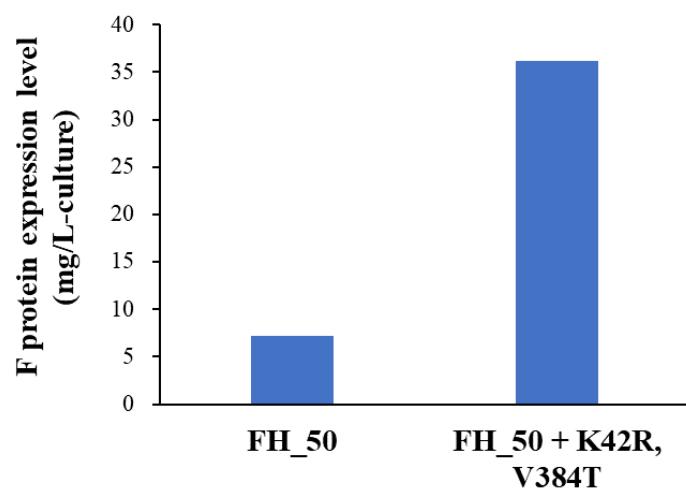


図 22 1L 培養あたりの F 蛋白質発現量

#### 第4節 小括

本章では、準安定な preF にのみ存在し、強力な中和活性エピトープとなる抗原部位 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、5つのアプローチでアミノ酸残基置換を設計し、site Ø に結合する抗体 D25 及び三量体 preF の site V に結合する抗体 AM14 に対する結合性と F 蛋白質の発現量を指標として、preF 特異的抗原部位の安定化及び F 蛋白質発現量の向上に効果があると考えられるアミノ酸残基置換を抽出した(図 23)。141 位及び 373 位のロイシン残基、142 位及び 373 位のロイシン残基をシステイン残基に置換した F 蛋白質変異体 FH\_08 及び FH\_09 は D25 に対する結合性が向上し、site Ø の保存性が向上したことが示唆された。FH\_08 の 135 位及び 136 位のアルギニン残基をアスパラギン残基に置換し、第 2 フーリン切断部位の切断を阻害した FH\_21 は AM14 に対する結合性が向上し、三量体 preF の形成または安定性が向上したことが示唆された。さらに、FH\_21 の 189 位をバリン残基に、190 位をバリン残基に置換した FH\_50 では、D25 及び AM14 に対する結合性は維持したまま、F 蛋白質の発現量が向上することが示された。preF のモデル構造を用いた計算解析からは 194 位のアスパラギン酸残基と 60 位のグルタミン酸残基の静電反発が preF の不安定性に寄与している可能性が示され、60 位のグルタミン酸残基をメチオニン残基、フェニルアラニン残基、ロイシン残基に置換することでエネルギー的に安定した状態になり、D25 及び AM14 に対する結合性が向上することが示された。最後に、FH\_50 は 42 位のリジン残基をアルギニン残基に置換し、さらに 384 位のバリン残基をトレオニン残基に置換することで、D25 及び AM14 に対する結合性を維持したまま、F 蛋白質の発現量が向上することが示された。これらのアミノ酸残基置換を組合わせることで site Ø 及び site V を安定的に保存する F 蛋白質を作製できることが期待された。そこで、次章ではアミノ酸残基置換を組合わせた F 蛋白質変異体を作製し、ワクチン抗原としての有用性を評価した。

【第2章 preF特異的抗原部位の安定化及び蛋白質発現量向上に有用なアミノ酸残基置換の探索】

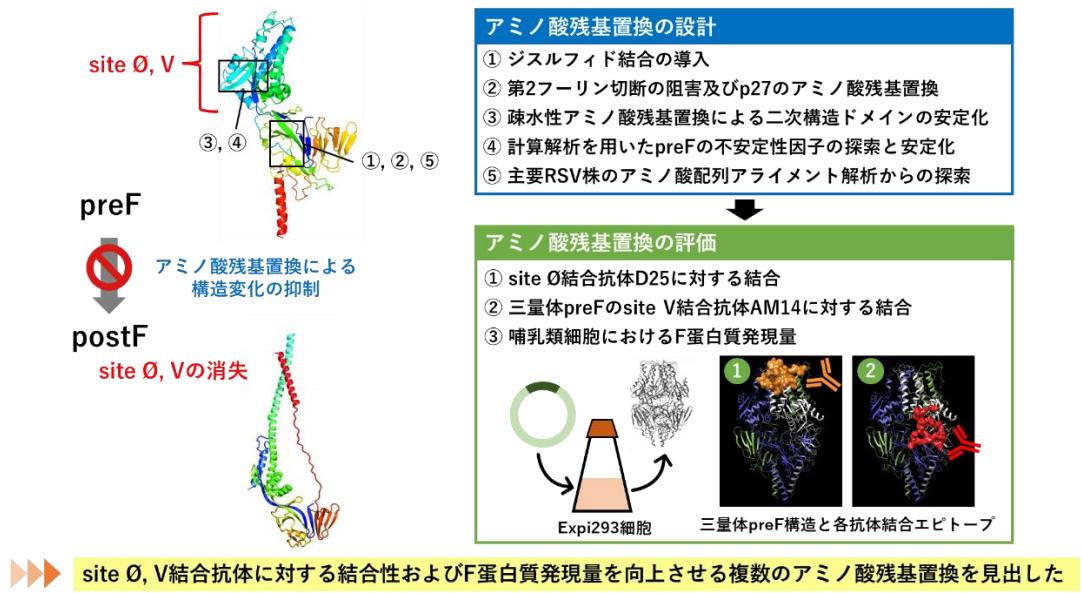


図 23 第2章で実施した内容のまとめ

## 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1節 緒言

本章では、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 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85を作製した。作製したF蛋白質変異体の性状を確認した後、ワクチン抗原としての有用性評価を行った。安全性と有効性の高いRSVワクチンを開発する上で、site Ø及びsite VといったpreF特異的抗原部位を安定的に保存しており、preF特異的抗原部位に結合する抗体を高い割合で誘導可能なワクチン抗原を開発することが最も重要である。本研究で見出したF蛋白質変異体FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85が上記を満たすワクチン抗原となり得るかを確認するため、強力な中和活性を示すpreF特異的エピトープを保存しているか、生体内において実際にpreF特異的抗体を誘導できるかについて評価した。比較対照として、配列情報や結晶構造、各種動物種での中和抗体誘導能が確認されており、ヒトにおいて上市品と同等の抗体誘導能を持つpreF安定化抗原DS-Cav1<sup>57,58</sup>と、アミノ酸残基置換を実施していないF-WT及びロゼット様の凝集を形成しないように改変した三量体postFであるΔFP<sup>73</sup>を用いた。

強力な中和活性を有し、かつエピトープが公知であるpreF特異的結合抗体D25, AM14, 5C4<sup>74</sup>, AM22<sup>75</sup>, 58c5<sup>76</sup>, hRSV90<sup>77</sup>との結合評価を行い、preF特異的エピトープを広く保存しているか評価した。preFは4°C保管や凍結融解に対しても不安定であり、preFを安定化させるアミノ酸残基置換を導入した場合でも、その効果が不十分な場合はpreF特異的エピトープが消失することが報告されている<sup>57,59</sup>。そこで本研究では、4°Cで30日間の保管及び凍結融解を実施し、上記と同様にpreF特異的結合抗体との結合評価を行うことでpreF特異的エピトープの安定性を確認した。

本研究で作製したF蛋白質変異体はヒト用ワクチン抗原を目的に作製しているため、ヒトでの有用性を示すことは非常に重要である。健常成人のメモリーB細胞を用いた抗F抗

体の特性評価から、健常成人では preF 特異的な抗原部位、preF と postF の両方に存在する抗原部位、postF 特異的な抗原部位、それぞれに結合する抗体を有しており、さらに、強力な中和活性を示す抗体の大部分が preF 特異的抗体であることが報告されている<sup>41,78</sup>。また、RSV は生涯に渡って繰返し感染し、血清中には F 蛋白質に結合する抗体が存在することが知られている<sup>79</sup>。そこで本研究では健常成人の血清検体を使用し、実際にヒトが自然感染によって誘導する中和抗体または非中和抗体のエピトープを FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が保存しているかを評価した。

最後に、マウスに FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を免疫し、血清中に誘導された preF 特異的抗体の誘導割合を確認することで、生体内における preF 特異的抗原部位の安定性及び preF 特異的抗体誘導能を評価した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### (1) F 蛋白質の作製

アミノ酸残基置換を組み合わせて導入した F 蛋白質変異体の作製は第 2 章第 2 節 (1) 項と同様の操作で実施した。評価に使用する比較対照として、F-WT に S155C, S290C, S190F, V207L を導入した preF 安定化抗原 DS-Cav1 及び F-WT の FP の 137–145 位のアミノ酸残基を欠失させた変異体 ΔFP を作製した。本章ではアフィニティー精製を行った後に Superdex 200 Increase (Cytiva) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、残存不純物を除去した。

### (2) 評価用抗体の作製

結合評価に使用する抗 RSV-F 抗体 AM22 (PDB ID: 6DC5), hRSV90 (PDB ID: 5TPN), 5C4 (PDB ID: 5W23), 58c5 (CR9501 (PDB ID: 6OE4) の VL, VH 領域から構成される) を追加で作製した。作製は第 2 章第 2 節 (2) 項と同様に実施した。

### (3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製した F 蛋白質の性状確認のため、SDS (Sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及び Blue Native PAGE (BN-PAGE) を行った。SDS-PAGE は NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) 及び NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen) を使用した。F 蛋白質 1 μg を NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) 及び NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen) と混合した。70°C で 10 分間インキュベート後、200 V, 35 分間泳動した。Bullet CBB Stain One (ナカライトスク) でゲルを染色し、超純水で脱色した後、画像撮影システムを用いてゲルの撮影を行った。BN-PAGE は NativePAGE 4–16% Bis-Tris Gel (Invitrogen) 及び NativePAGE Running Buffer Kit (Invitrogen) を使用した。F 蛋白質 2 μg と NativePAGE

Sample Buffer (Invitrogen) を混合し、150 V、110 分間泳動した。メタノール及び酢酸を用いて固定、脱色した後、画像撮影システムを用いてゲルの撮影を行った。

#### (4) 動的光散乱法による粒子径測定

DynaPro Plate Reader III (Wyatt Technology Corporation) を使用した動的光散乱法 (DLS) によって F 蛋白質の粒子径を測定した。F 蛋白質は PBS を用いて 1 mg/mL に希釈し、384 ウエルマイクロプレートにアプライした。DLS 検出器の角度は 150°、温度は 25°C で 5 秒間の測定を 10 回測定した。測定データは解析ソフトウェア DYNAMICS によるレギュラリゼーション解析を実施した。

#### (5) 構造認識抗体を用いたエピトープの保存性評価

F 蛋白質と Palivizumab, D25, AM14, AM22, hRSV90, 5C4, 58c5 の結合を測定し、エピトープの保存性を評価した。測定は第 2 章第 2 節 (3) 項と同様の条件で実施した。Octet 解析ソフトウェアを用いて Initial slope 解析を行い、各抗体に対する結合レスポンスを算出した。各抗体に対する結合レスポンスは Palivizumab に対する結合レスポンスとの比を求めることで、正規化した。

#### (6) マウス免疫血清の取得

本動物実験は田辺三菱製薬株式会社の「動物実験等の適切な実施に関する要領」に従い、動物実験委員会の審査・承認を受けて実施した。BALB/cAnNCrlCrlj (雌、7 週齢) (日本チャールズ・リバー) に F 蛋白質変異体 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85, DS-Cav1, F-WT を免疫することでマウス免疫血清を取得した。F 蛋白質 20 µg (1% Alhydrogel® アジュvant (InvivoGen) 含有 PBS 溶液) をマウスの後肢大腿部に 2 回 (2 回目接種は 1 回目接種後 21 日目) 筋肉内投与した (1 群あたり 5 匹)。1 回目の投与から 42 日目に後大静脈から血液を採

取し, 室温で 2 時間インキュベートした. インキュベーション後に血液を遠心分離して上清を回収し, 55 °C で 30 分間インキュベートして不活性化した.

#### (7) ヒト血清およびマウス免疫血清中の抗 F 抗体の吸着

BioIVT 社から入手した健常成人の血清は 56°C で 30 分間不活性化して使用した. Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Thermo Fisher Scientific) に F 蛋白質 20 µg を添加後, 4°C で 1 時間インキュベートし, 磁気ビーズに F 蛋白質を結合させた. ヒト血清を用いた評価では F 蛋白質変異体 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85, DS-Cav1, ΔFP を使用し, マウス免疫血清を用いた評価では ΔFP を使用した. F 蛋白質結合ビーズは Blocking buffer (2%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 PBS) を添加し, 4°C で 30 分間インキュベートした. Blocking buffer を用いてヒト血清サンプルは 10 倍希釈, マウス免疫血清は 20 倍希釈し, ビーズに 1 mL を添加後, 4°C で 1 時間インキュベートさせることで, 血清中の抗 F 抗体を吸着した. インキュベーション後, 磁気を用いてビーズと溶液を分離し, 溶液を回収した.

#### (8) ヒト血清中の抗 postF 抗体価の測定

ヒト血清中の抗 postF 抗体価は酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA 法) によって測定した. 96 ハーフウェルプレートに 0.05 M 炭酸-重炭酸バッファー (Sigma-Aldrich) で希釈した 2 pmol の F 蛋白質変異体 ΔFP を添加し, 4°C で一晩インキュベートした. TBS-T (0.05% Tween 20) でプレートを洗浄した後, Blocking buffer (0.3% BSA/TBS-T) でプロッキングした. ヒト血清サンプルは Blocking buffer を用いて希釈系列を作製し, プレートに添加して室温で 1 時間インキュベートした. プレート洗浄後, ペルオキシダーゼ結合抗ヒト IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories) を添加し, 室温で 1 時間インキュベートした. プレート洗浄後, ペルオキシダーゼ用発色キット (住友ベークライト) を使用して発色させた. プレートリーダーを使用して 492 nm における吸光度を測定し, 吸光度が 0.2 となる希釈率の逆数を

抗 postF 抗体の抗体価とした。吸着操作前の血清サンプルの抗体価を 100 とし、吸着操作後の血清サンプルの抗体価を相対値として示した。

#### (9) マウス免疫血清中の抗 preF 抗体価測定

マウス免疫血清中の抗 preF 抗体価は ELISA 法によって測定した。96 ハーフウェルプレートに 0.05 M 炭酸-重炭酸バッファーで希釈した 2 pmol の DS-Cav1 を添加し、4°C で一晩インキュベートした。PBS-T(0.05% Tween 20) でプレートを洗浄した後、Blocking buffer(2% BSA/PBS-T) でブロッキングした。マウス免疫血清サンプルは Blocking buffer を用いて希釈系列を作製し、プレートに添加して室温で 1 時間インキュベートした。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG 抗体 (Dako) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ用発色キットを使用して発色させた。プレートリーダーを使用して 492 nm における吸光度を測定し、吸光度が 0.2 となる希釈率の逆数を抗 preF 抗体の抗体価とした。吸着操作前の血清サンプルの抗体価を 100 とし、吸着操作後の血清サンプルの抗体価を相対値として示した。

#### (10) ウィルス中和活性評価

RS ウィルス strain A2 (American Type Culture Collection, ATCC) 及び Vero 細胞 CCL-81 (ATCC) を用いてウィルス中和活性評価を行った。PBS を用いて評価サンプル (血清) の希釈系列を作製し、RS ウィルスと混合して室温で 30 分間インキュベートした。前日に 96 ウェルプレートに  $4 \times 10^4$  cells/well で播種しておいた Vero 細胞に血清/ウィルス溶液を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。血清/ウィルス溶液を除去した後、DMEM, High Glucose (Thermo Fisher Scientific) に 100 mM-ピルビン酸ナトリウム溶液 (100 倍濃縮)(ナカライトスク) と抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (100 倍濃縮) (ナカライトスク) をそれぞれ 1% (v/v) 添加した培地を 100 μL/well 添加し、37 °C で 16 時間インキュベートした。2%パラホルムア

ルデヒドで細胞を固定し、0.2% Triton X-100(ナカライトスク)で透過処理をした。感染細胞を Alexa Fluor 488 標識抗 RS ウィルス抗体 clone 133-1H (Merck) で、全細胞の核を Heochst33258 (Dojindo) で染色した。細胞画像解析装置 IN Cell Analyzer (Cytiva) 用いて感染細胞領域中の核の数をカウントし、ウィルス感染細胞数とした。血清を添加していない場合の平均ウィルス感染細胞数を感染率 100%と定義し、各血清の感染率を算出した。シグモイド曲線は GraphPad Prism (GraphPad Software) を用いたロジスティックモデルによる非線形回帰により作成した。

### 第3節 結果および考察

#### F蛋白質変異体 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 の作製及び性状確認

第2章で見出した preF 特異的抗原部位の安定化及び F 蛋白質発現量の向上に有用なアミノ酸残基置換を組合わせて、4つの F 蛋白質変異体を作製した（表3）。比較対照として、変異導入前の F-WT、結晶構造が明らかにされている三量体 preF 安定化抗原 DS-Cav1、三量体 postF 抗原 ΔFP を同様に作製した。精製した F 蛋白質変異体の性状確認として、還元条件での SDS-PAGE を実施したところ、50–60 kDa 付近に F1、20 kDa 付近に F2 と考えられる主要なバンドが確認された（図24）。F1 については FP の一部を欠失させた ΔFP が最も小さく、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は第2フーリン切断部位のアミノ酸残基置換により N末端に p27 が存在する為、DS-Cav1 と比べてわずかに分子量が大きくなっていることが確認された。非変性条件での BN-PAGE では、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は 480 kDa 付近にメインバンドが観察されたが、F-WT では明確なバンドが検出されなかった（図25）。三量体 F 蛋白質は 10–20 nm の粒子径であることが報告されているため<sup>29,80</sup>、DLS 法により溶液中の粒子径を測定した。その結果、DS-Cav1, FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 では 14–17 nm の粒子径ピークが確認されたが、F-WT はブロードな粒子径分布を示した（図26）。preF では FP が蛋白質の中心に埋もれているが、postF への構造変化で FP が露出し、ロゼット様の凝集を形成することが報告されている<sup>81</sup>。ロゼット様の凝集を形成しない三量体 postF である ΔFP では 12 nm の粒子径ピークが観察されたことから、F-WT では postF への構造変化が生じ、ロゼット様の凝集を形成していることが考えられた。以上の結果より、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は postF への構造変化が抑制されている可能性が示唆された。

表 3 作製した F 蛋白質変異体

F 蛋白質変異体	アミノ酸残基置換
FH_50	L141C, L373C, R135N, R136N, T189V, S190V
FH_81	L141C, L373C, R135N, R136N, T189V, S190V, E60M
FH_82	L141C, L373C, R135N, R136N, T189V, S190V, K42R, V384T
FH_85	L141C, L373C, R135N, R136N, T189V, S190V, E60M, K42R, V384T

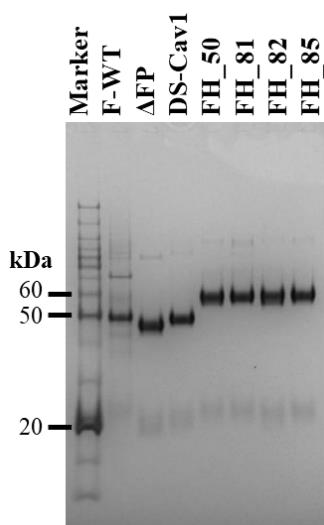


図 24 還元条件での SDS-PAGE 像

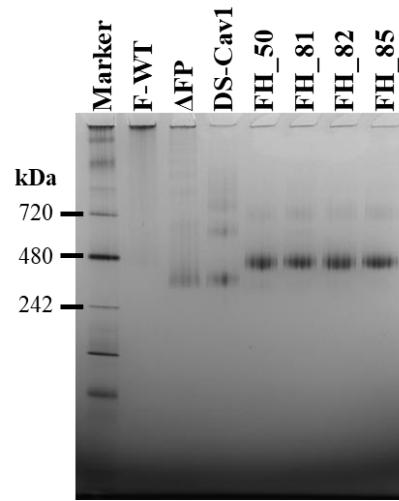


図 25 非変性条件での BN-PAGE 像

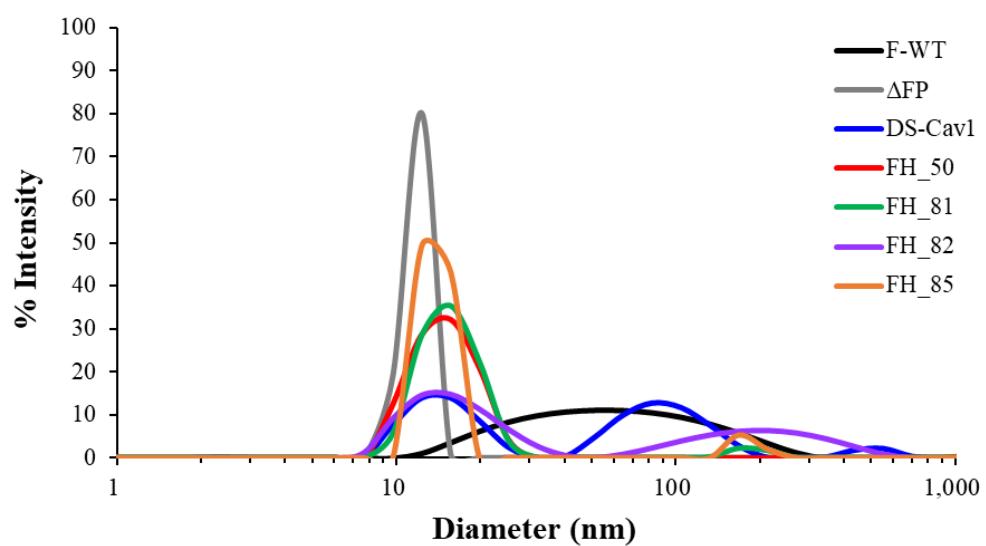


図 26 F 蛋白質の粒子径分布

## 構造認識抗体を用いた preF 特異的エピトープの保存性評価

エピトープが公知であり、強力な中和活性を有する複数の preF 特異的抗体との結合を評価することで preF 特異的エピトープの保存性を評価した。 preF 特異的抗原部位である site Ø に結合する D25, 5C4, AM22, site V に結合する 58c5, hRSV90, 三量体 preF 特異的な siteV に結合する AM14 に対する結合を確認した。 F-WT は全ての preF 特異的抗体において結合を確認できなかったが、 DS-Cav1 及び FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は全ての preF 特異的抗体に対する結合レスポンスが確認された (図 27)。 4°C で 30 日間の保管及び凍結融解後においても、 preF 特異的抗体に対する結合レスポンスは低下しなかった。この結果から、 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は図 28 に示す preF 特異的抗原部位である site Ø 及び site V の複数のエピトープを保存しており、保管によってこれらのエピトープが消失しないことが示された。一方で、 postF の抗原部位 site I に結合し、ほとんど中和活性を持たない抗体 131-2A<sup>40</sup> に対して、 F-WT では高い結合レスポンスを示したが、 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は結合レスポンスが低く、 DS-Cav1 よりも低かった (図 29)。この結果から、 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が DS-Cav1 と比べて postF 特異的抗原部位である site I を保持する F 蛋白質の存在割合が低いことが示唆された。

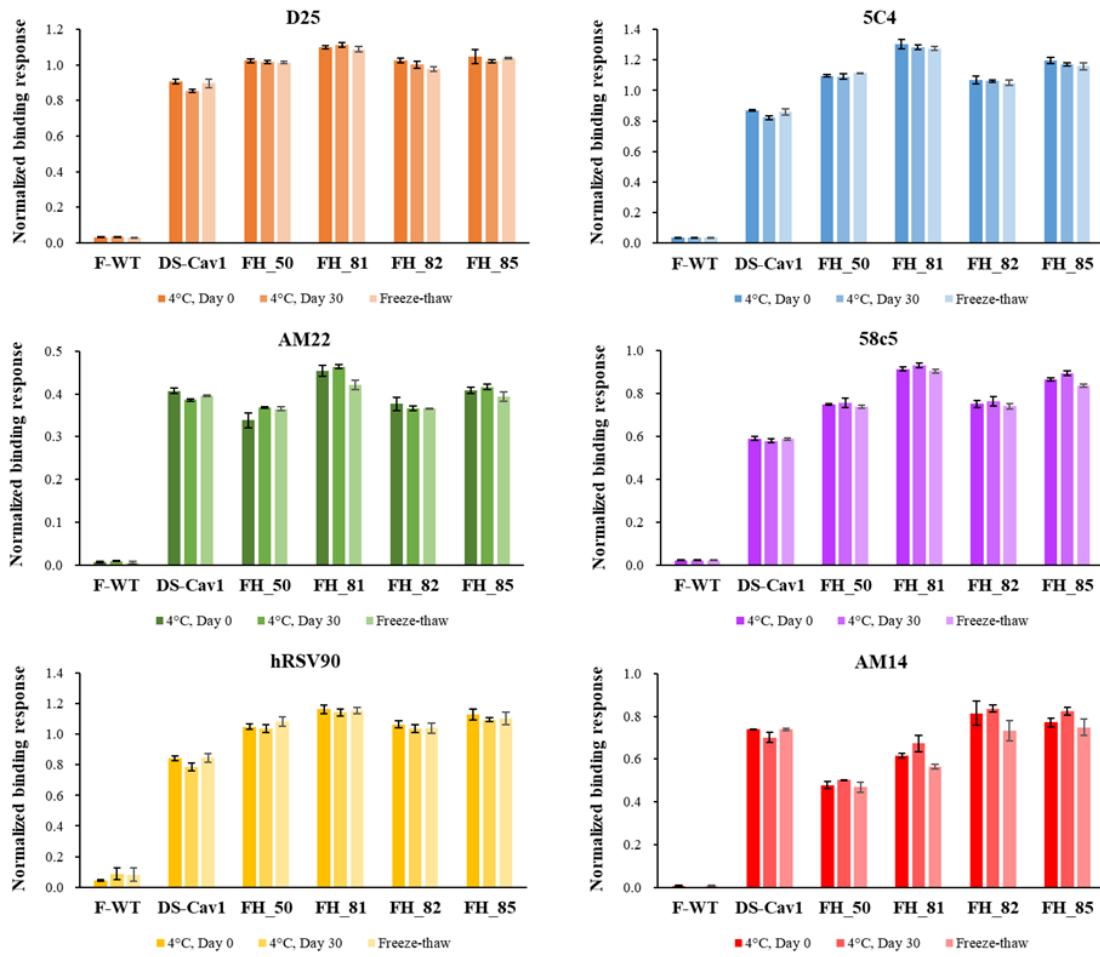


図 27 preF 特異的抗体に対する結合レスポンス

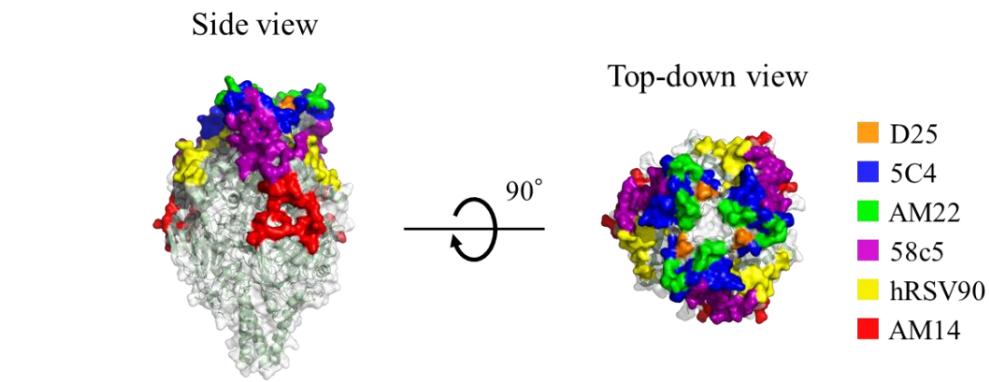


図 28 構造認識抗体のエピトープをマッピングした三量体 preF 構造

DS-Cav1 と AM14 の複合体 (PDB ID: 7MPG) を元に作成。

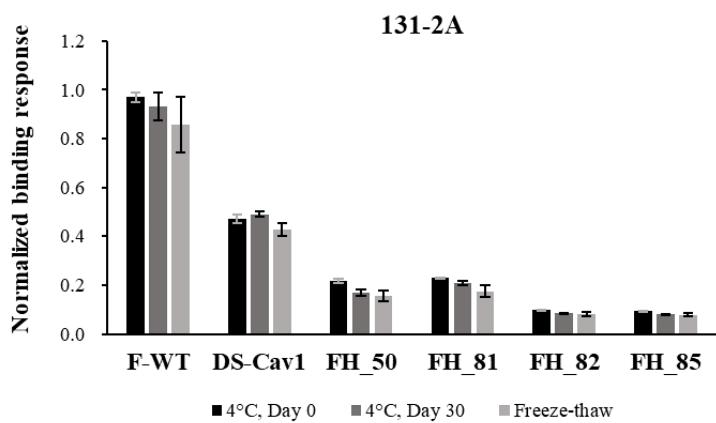


図 29 131-2A に対する結合レスポンス

#### ヒトで誘導される中和抗体及び非中和抗体のエピトープ保存性評価

実際にヒトで自然感染によって誘導される中和抗体または非中和抗体のエピトープを FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が保存しているか評価するため、健常成人の血清と ΔFP, DS-Cav1, FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を混合し、血清中の抗 F 抗体を吸着した。ΔFP は血清中の抗 postF 抗体をほぼ全て吸着したが、吸着前と同等の中和活性を維持していた（図 30, 31）。この結果は、ヒト血清中に含まれる抗 postF 抗体が中和活性を有さない非中和抗体であることを示している。ΔFP と同様に、DS-Cav1 はほぼ全ての抗 postF 抗体を吸着したが、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は約 50% の抗 postF 抗体を吸着しなかった。しかし、いずれも吸着後の血清は中和活性が低下しており、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が、ヒトにおいて自然感染によって誘導される中和抗体のエピトープを保存していることが確認された。抗 postF 抗体の吸着率の違いは、DS-Cav1 と比較して FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が非中和抗体のエピトープを有していないことを示している。このことから、ワクチン開発における安全性懸念

の一つとして挙げていた ADE を誘発するリスクが低く、安全性の観点からも優れたワクチン抗原となり得る可能性が示唆された。

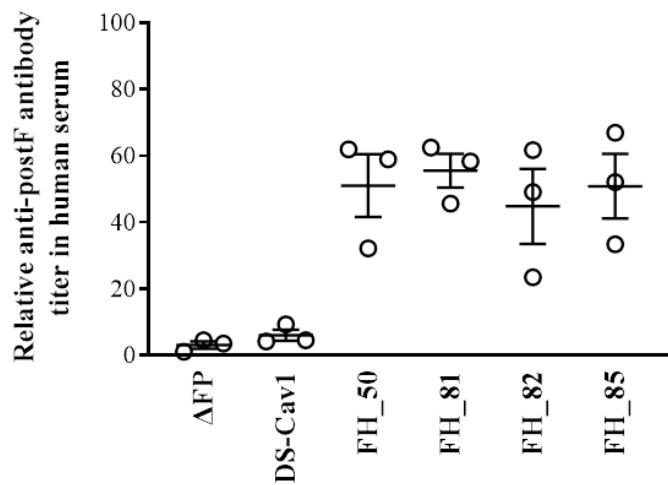


図 30 吸着後のヒト血清中の抗 postF 抗体価

吸着前の抗 postF 抗体価を 100 とした時の相対値で示す。

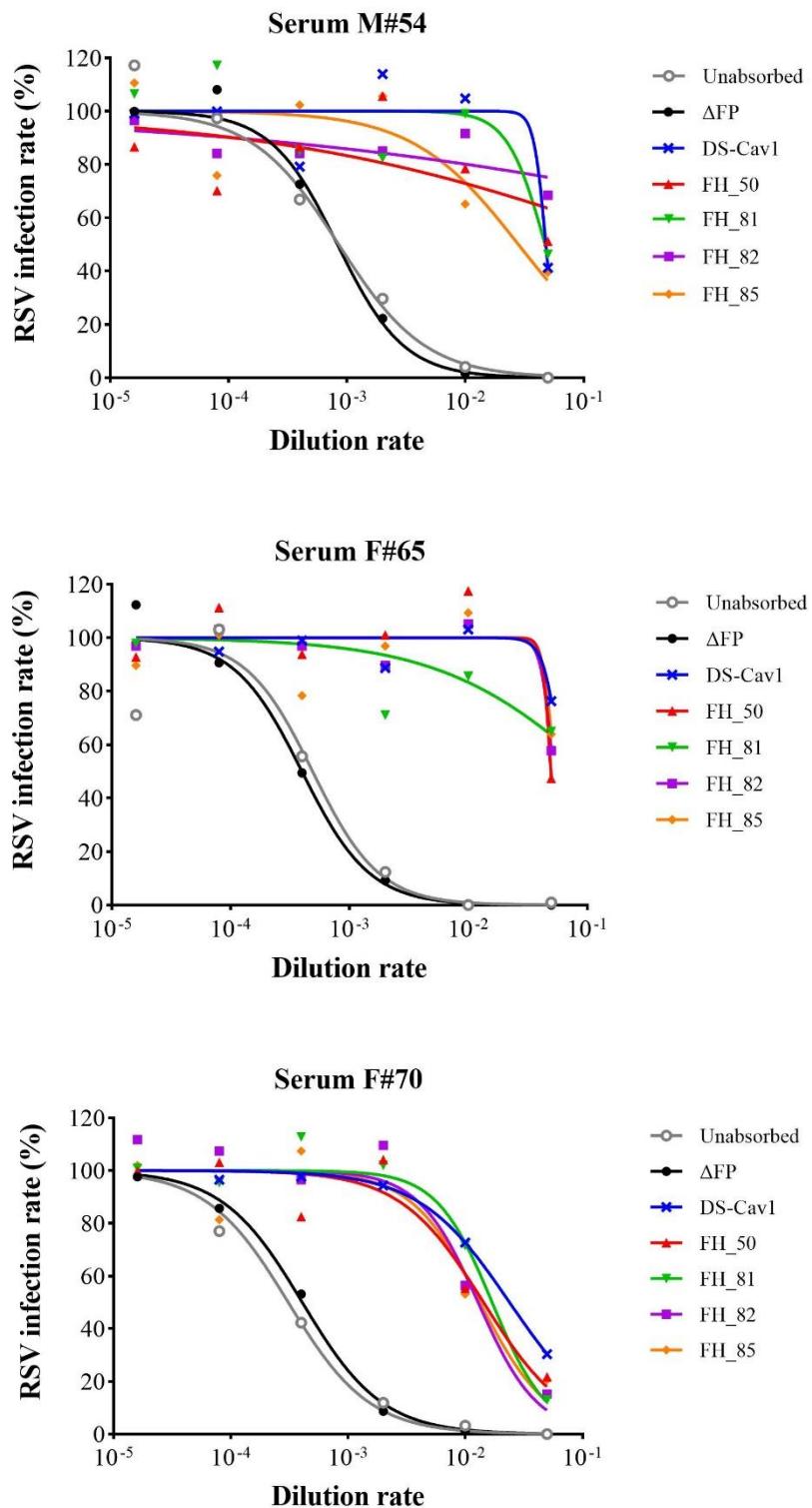


図 31 各ヒト血清の中和活性

### preF 特異的抗体誘導能の評価

FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が生体内で preF 特異的抗原部位を保存し, preF 特異的抗体を誘導可能か評価した。マウスに F-WT, DS-Cav1, FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 をそれぞれ免疫し, マウス免疫血清を取得した。ΔFP を用いて preF 及び postF のいずれにも存在する抗原部位に結合する抗体を吸着し, 吸着前後の preF 抗体値を確認することで, preF 特異的抗原部位に結合する抗体の誘導を確認した。F-WT を免疫したマウス免疫血清では吸着操作によって全ての抗 preF 抗体が除去され, preF 特異的抗体は誘導されなかったことが示された (図 32)。一方, DS-Cav1 を免疫したマウス免疫血清では吸着後も約 43%の抗 preF 抗体が検出され, preF 特異的抗体が誘導されたことが示された。FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を免疫したマウス免疫血清では吸着後も約 72–90%の抗 preF 抗体が検出され, DS-Cav1 よりも高い割合で preF 特異的抗体を誘導したことが確認された。以上の結果から, FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が生体内においても preF 特異的抗原部位を保存しており, preF 特異的抗体を誘導可能な抗原であることが示された。

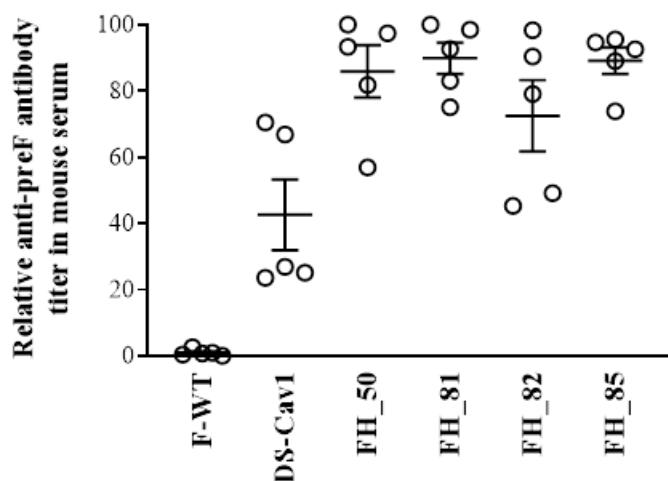


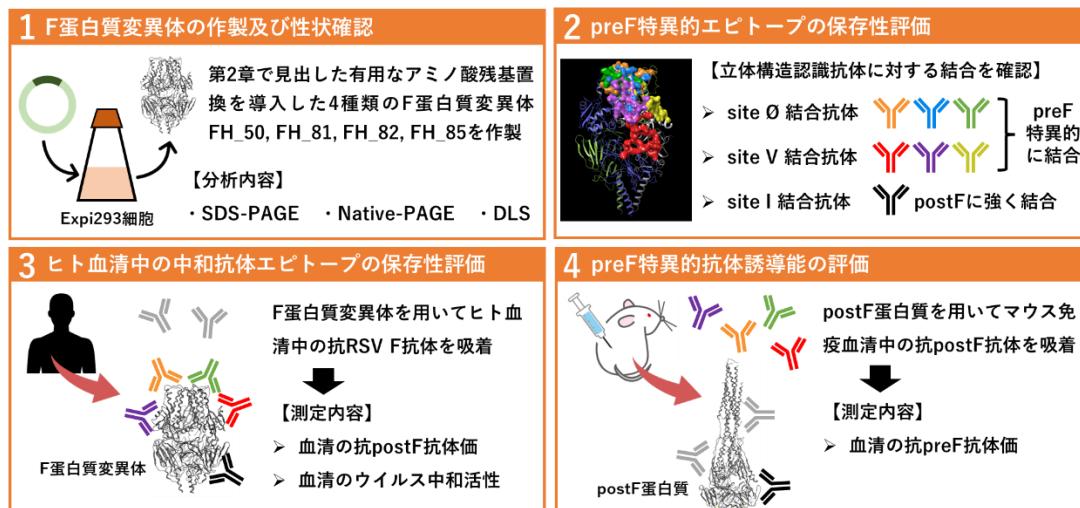
図 32 吸着後のマウス免疫血清中の抗 preF 抗体値

吸着操作前の抗 preF 抗体値を 100 とした時の相対値で示す。

#### 第4節 小括

本章では、第2章で見出したアミノ酸残基置換を組合させた4つのF蛋白質変異体FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85を作製し、ワクチン抗原としての有用性評価を行った(図33)。強い中和活性を有する6種類のpreF特異的抗体に対する結合を確認したところ、F-WTと比べてFH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85は結合性が高く、4°Cで30日間の保管及び凍結融解後も結合性を維持していた。この結果はFH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85がpreF特異的抗原部位の複数のエピトープを安定的に保存していることを示唆している。自然感染によってヒトで產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、ヒトの血清検体を用いて評価したところ、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85で吸着した血清は中和活性が大きく減少し、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85が中和活性を示すエピトープを広く保存していることを示唆する結果が得られた。エピトープの保存性評価において、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85はpostF結合抗体131-2Aに対する結合性が低く、さらに、血清中の抗postF抗体の約50%を吸着せず、preF安定化抗原DS-Cav1と抗postF抗体に対する結合性の違いがあることが明らかとなった。FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85をマウスに免疫し、生体内におけるpreF特異的抗原部位の安定性及びpreF特異的抗体誘導能の評価を行ったところ、DS-Cav1を免疫した場合よりも高い割合でpreF特異的抗体が誘導されており、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85が生体内においても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】



▶▶▶ preF特異的抗原部位を保存し、高い割合でpreF特異的結合抗体を誘導可能なF蛋白質変異体を見出した

図 33 第3章で実施した内容のまとめ

## 第4章 総括

RSV 感染症には未だアンメットメディカルニーズが存在し、安全性と有効性の高い RSV ワクチンの開発は依然として重要な課題である。本学位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  $\emptyset$  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章において、立体構造の観察および計算解析、ウイルス株のアライメント解析を行い、site  $\emptyset$  及び三量体 preF の site V のエピト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た。

第3章では、見出したアミノ酸残基置換を組合わせた4つのF蛋白質変異体 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を作製し、ワクチン抗原としての有用性の評価を行った。FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 は preF 特異的抗原部位 site  $\emptyset$  及び site V 上のエピトープを広く保存しており、自然感染によってヒトで産生された中和抗体のエピトープも保存していることが示された。さらに、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 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 特異的抗原部位を保存し、preF 特異的抗体を誘導可能な抗原であることが示された。また、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 の特徴として、ヒトにおいて上市品と同等の抗体誘導能を持つ preF 安定化抗原 DS-Cav1 と比べて中和活性を示さない抗 postF 抗体に対する結合性が低いことが示された。

以上より、本学位論文において、preF 特異的抗原部位 site  $\emptyset$  及び site V を含むエピトープを広く保存し、高い割合で preF 特異的結合抗体を誘導可能な F 蛋白質変異体 FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を見出した。抗 postF 抗体に対する結合性の低さから、FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 が ADE を引き起こす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。

本研究の成果を踏まえ、今後の研究においては RSV 免疫応答及び感染防御について評価可能なヒトへの外挿性が高い動物モデルの構築と、有効性と安全性の高いワクチン開発のための製剤化及び剤形の検討が必要であると考える。

RSV ワクチン候補のヒトでの有効性の評価として、ヒト RSV をマウスやコットンラットに感染させるモデルや、マウス肺炎ウイルスなどの非ヒト肺炎ウイルスを用いて自然宿主で評価する動物モデルが採用されているが、これらの動物モデルはヒト RSV 感染の病態を完全に再現するものではなく、ヒトにおける RSV ワクチン候補の有効性をどの程度予測できるかは明らかではない<sup>82</sup>。乳児のヒト RSV と子牛の牛 RSV の疫学的類似性やヒト RSV と牛 RSV の遺伝的及び抗原的類似性から、牛 RSV 感染の子牛モデルはヒトの RSV ワクチン候補の評価に適したモデルであると考えられるが、子牛を用いた実験は実施のハードルが非常に高い。European Medicines Agency の RSV ワクチンの臨床試験に関するガイドラインにおいても、非臨床試験はヒトにおける効果の予測性が低い場合があるため、非臨床 *in vivo* 試験を実施する前にその試験を実施する価値があると考えられるかを考慮すべきであると述べられている<sup>83</sup>。今後、RSV ワクチン抗原として FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 の研究開発を進めていく上で、ヒトでの有効性を予測可能な動物モデルを検討することは重要な課題である。

一般的に組換え蛋白質抗原は免疫原性が低く、感染防御に十分な免疫応答を誘導できない可能性があり、免疫応答を増強するアジュバントの検討や剤形の検討が必要であると考える。RSV 感染症においては、液性免疫が重要な役割を果たしていると考えられている<sup>84</sup>。中和抗体はウイルスが細胞に侵入するのを防ぎ、実際に、中和抗体が RSV 感染予防効果及び重症化予防効果を持つ事を示す臨床的エビデンスがある<sup>85</sup>。一方で、感染や発症の完全な防御においては、感染した細胞を直接攻撃し、ウイルスの拡散を防ぐ細胞性免疫も重要である為、液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導可能なワクチンが望ましいと考える。現在、多くのアジュバントについてヒトでの有用性が示されているが、アジュバントはウイルスやワ

クチン抗原との相性もある為、有効性と安全性の高いワクチンを開発するにはアジュvant の適切な選択と配合が重要となる。また、免疫応答を増強する戦略の一つとして、抗原の粒子化も考えられる。粒子化により、リンパ節への移行性を高める事や、抗原提示細胞に効率的に取り込まれることが知られている<sup>86</sup>。さらに、粒子化によって、多くの抗原を高密度に提示する事で、B 細胞受容体を効果的にクラスター化でき、B 細胞の活性化が強化されることによって、より強力な抗体産生誘導を引き起こすことが可能となる<sup>87</sup>。preF 安定化抗原である DS-Cav1 において、Icosavax 社の粒子化技術を用いて作製した粒子状抗原では、粒子上に提示されている DS-Cav1 の約 86%が postF へ構造変化していることが報告されている<sup>88</sup>。このことから、本研究で見出した F 蛋白質変異体を粒子化する上では、複数の粒子化技術を検討する事に加え、preF 特異的抗原部位を更に安定化させるためのアミノ酸残基置換が必要となる可能性も考えられる。

本研究で FH\_50, FH\_81, FH\_82, FH\_85 を見出すに至るまでのアミノ酸残基置換の設計アプローチや評価手法はメタニューモウイルス (Metapneumovirus, MPV) やパラインフルエンザウイルス (Parainfluenza virus, PIV) のワクチン開発においても貢献することが期待される。MPV 及び PIV は呼吸器感染症の原因ウイルスであり、RSV と同様に生涯にわたって繰返し感染を繰り返し、特に乳幼児や高齢者は重篤な下気道感染症へ進展する危険性が高い為、治療薬や予防ワクチンの開発が望まれている<sup>89,90</sup>。MPV 及び PIV は RSV と同じクラス I の膜融合蛋白質を有し、準安定な preF 構造の膜融合蛋白質は中和抗体やワクチン開発の重要なターゲットと考えられている。本研究の知見を MPV 及び PIV ワクチンの研究開発に繋ぐことで、ウイルス感染による呼吸器疾患の重症化から人々を保護することに貢献できると考える。

## 本論文に関する発表論文

1. **Matsuyama-Ito, R.**, Hogiri, T., Kishida, H., Takedomi, K., Okada, O., Nishizawa, A., Higashi-Nakatani, S., Omasa, T. Generation of novel respiratory syncytial virus vaccine candidate antigens that can induce high levels of prefusion-specific antibodies. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **138**, 127-136, doi:10.1016/j.jbiosc.2024.05.008 (2024).

## その他 発表論文

1. **Matsuyama, R.**, Tsutsui, T., Lee, K.H., Onitsuka, M., Omasa, T. Improved gene amplification by cell-cycle engineering combined with the Cre-loxP system in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **120**, 701-708, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.009 (2015).
2. **Matsuyama, R.**, Yamano, N., Kawamura, N., Omasa, T. Lengthening of high-yield production levels of monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells by downregulation of breast cancer 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **123**, 382-389, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.006. (2016)

## 引用文献

- 1 Ricco, M. *et al.* Infodemiology of RSV in Italy (2017-2022): an alternative option for the surveillance of incident cases in pediatric age? *Children* **9**, doi:10.3390/children9121984 (2022).
- 2 Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American journal of diseases of children* **140**, 543-546, doi:10.1001/archpedi.1986.02140200053026 (1986).
- 3 Wang, X. *et al.* Global disease burden of and risk factors for acute lower respiratory infections caused by respiratory syncytial virus in preterm infants and young children in 2019: a systematic review and meta-analysis of aggregated and individual participant data. *The lancet* **403**, 1241-1253, doi:10.1016/S0140-6736(24)00138-7 (2024).
- 4 Hall, C. B., Simoes, E. A. & Anderson, L. J. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus. *Current topics in microbiology and immunology* **372**, 39-57, doi:10.1007/978-3-642-38919-1\_2 (2013).
- 5 Du, Y. *et al.* Global burden and trends of respiratory syncytial virus infection across different age groups from 1990 to 2019: A systematic analysis of the global burden of disease 2019 study. *International journal of infectious diseases* **135**, 70-76, doi:10.1016/j.ijid.2023.08.008 (2023).
- 6 Li, Y. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The lancet* **399**, 2047-2064, doi:10.1016/s0140-6736(22)00478-0 (2022).
- 7 Stein, R. T. *et al.* Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *The lancet* **354**, 541-545, doi:10.1016/s0140-6736(98)10321-5 (1999).
- 8 Pérez-Yarza, E. G., Moreno, A., Lázaro, P., Mejías, A. & Ramilo, O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *The pediatric infectious disease journal* **26**, 733-739, doi:10.1097/INF.0b013e3180618c42 (2007).
- 9 Nagasawa, K. & Ishiwada, N. Disease burden of respiratory syncytial virus infection in the pediatric population in Japan. *Journal of infection and chemotherapy* **28**, 146-157, doi:10.1016/j.jiac.2021.11.007 (2022).
- 10 Igarashi A, T. K., Kobayashi Y, Kamei K, Yonemoto N, Ishiwada N. Inpatient and outpatient costs associated with respiratory syncytial virus in Japanese infants and older adults. *Future virology* **18**, 643-657.
- 11 Modjarrad, K. *et al.* WHO consultation on respiratory syncytial virus vaccine development report from a world health organization meeting held on 23-24 March 2015. *Vaccine* **34**, 190-197, doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.093 (2016).
- 12 厚生労働省. 予防接種に関する基本的な計画, 厚生労働省告示第 121 号. (2013).
- 13 ワクチン開発・生産体制強化戦略 (令和 3 年 6 月 1 日閣議決定).

- 14 Battles, M. B. & McLellan, J. S. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature reviews microbiology* **17**, 233-245, doi:10.1038/s41579-019-0149-x (2019).
- 15 McLellan, J. S., Ray, W. C. & Peeples, M. E. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Current topics in microbiology and immunology* **372**, 83-104, doi:10.1007/978-3-642-38919-1\_4 (2013).
- 16 Techapornkul, S., Barreto, N. & Peeples, M. E. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *Journal of virology* **75**, 6825-6834, doi:10.1128/jvi.75.15.6825-6834.2001 (2001).
- 17 Rixon, H. W. M. *et al.* The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *Journal of general virology* **85**, 1153-1165, doi:10.1099/vir.0.19769-0 (2004).
- 18 Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R. & Collins, P. L. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *Journal of virology* **71**, 8973-8982, doi:10.1128/jvi.71.12.8973-8982.1997 (1997).
- 19 Agoti, C. N. *et al.* Local evolutionary patterns of human respiratory syncytial virus derived from whole-genome sequencing. *Journal of virology* **89**, 3444-3454, doi:10.1128/jvi.03391-14 (2015).
- 20 Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A. & Collins, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **84**, 5625-5629, doi:10.1073/pnas.84.16.5625 (1987).
- 21 Higgins, D., Trujillo, C. & Keech, C. Advances in RSV vaccine research and development - A global agenda. *Vaccine* **34**, 2870-2875, doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.109 (2016).
- 22 Yin, H. S., Paterson, R. G., Wen, X., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **102**, 9288-9293, doi:10.1073/pnas.0503989102 (2005).
- 23 Bose, S., Jardetzky, T. S. & Lamb, R. A. Timing is everything: fine-tuned molecular machines orchestrate paramyxovirus entry. *Virology* **479-480**, 518-531, doi:10.1016/j.virol.2015.02.037 (2015).
- 24 Collins, P. L. & Mottet, G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Journal of general virology* **72 ( Pt 12)**, 3095-3101, doi:10.1099/0022-1317-72-12-3095 (1991).
- 25 Hu, M., Bogoyevitch, M. A. & Jans, D. A. Impact of respiratory syncytial virus infection on host functions: implications for antiviral strategies. *Physiological reviews* **100**, 1527-1594, doi:10.1152/physrev.00030.2019 (2020).

- 26 Smith, E. C., Popa, A., Chang, A., Masante, C. & Dutch, R. E. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *The FEBS journal* **276**, 7217-7227, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07401.x (2009).
- 27 Colman, P. M. & Lawrence, M. C. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature reviews molecular cell biology* **4**, 309-319, doi:10.1038/nrm1076 (2003).
- 28 Liljeroos, L., Krzyzaniak, M. A., Helenius, A. & Butcher, S. J. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **110**, 11133-11138, doi:10.1073/pnas.1309070110 (2013).
- 29 Chaiwatpongsakorn, S., Epand, R. F., Collins, P. L., Epand, R. M. & Peeples, M. E. Soluble respiratory syncytial virus fusion protein in the fully cleaved, pretriggered state is triggered by exposure to low-molarity buffer. *Journal of virology* **85**, 3968-3977, doi:10.1128/jvi.01813-10 (2011).
- 30 Gupta, C. K., Leszczynski, J., Gupta, R. K. & Siber, G. R. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine* **14**, 1417-1420, doi:10.1016/s0264-410x(96)00096-5 (1996).
- 31 Flynn, J. A. *et al.* Stability characterization of a vaccine antigen based on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Plos one* **11**, e0164789, doi:10.1371/journal.pone.0164789 (2016).
- 32 McLellan, J. S. *et al.* Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science* **340**, 1113-1117, doi:10.1126/science.1234914 (2013).
- 33 Gilman, M. S. *et al.* Characterization of a prefusion-specific antibody that recognizes a quaternary, cleavage-dependent epitope on the RSV fusion glycoprotein. *Plos pathogens* **11**, e1005035, doi:10.1371/journal.ppat.1005035 (2015).
- 34 Corti, D. *et al.* Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* **501**, 439-443, doi:10.1038/nature12442 (2013).
- 35 Yi, C. *et al.* A human antibody potently neutralizes RSV by targeting the conserved hydrophobic region of prefusion F. *Science china life sciences* **66**, 729-742, doi:10.1007/s11427-022-2250-0 (2023).
- 36 Kwakkenbos, M. J. *et al.* Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nature medicine* **16**, 123-128, doi:10.1038/nm.2071 (2010).
- 37 van Mechelen, L., Luytjes, W., de Haan, C. A. & Wicht, O. RSV neutralization by palivizumab, but not by monoclonal antibodies targeting other epitopes, is augmented by Fc gamma receptors. *Antiviral research* **132**, 1-5, doi:10.1016/j.antiviral.2016.05.003 (2016).

- 38 Zhu, Q. *et al.* A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants. *Science translational medicine* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aaj1928 (2017).
- 39 Goodwin, E. *et al.* Infants infected with respiratory syncytial virus generate potent neutralizing antibodies that lack somatic hypermutation. *Immunity* **48**, 339-349.e335, doi:10.1016/j.immuni.2018.01.005 (2018).
- 40 Ye, X. *et al.* Antigenic site-specific competitive antibody responses to the fusion protein of respiratory syncytial virus were associated with viral clearance in hematopoietic cell transplantation adults. *Frontiers in immunology* **10**, 706, doi:10.3389/fimmu.2019.00706 (2019).
- 41 Andreano, E. *et al.* The respiratory syncytial virus (RSV) prefusion F-protein functional antibody repertoire in adult healthy donors. *EMBO molecular medicine* **13**, e14035, doi:10.15252/emmm.202114035 (2021).
- 42 Graham, B. S. Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Current opinion in virology* **23**, 107-112, doi:10.1016/j.coviro.2017.03.012 (2017).
- 43 Chin, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schieble, J. H. & Lennette, E. H. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. *American journal of epidemiology* **89**, 449-463, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120957 (1969).
- 44 Fulginiti, V. A. *et al.* Respiratory virus immunization: a field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American journal of epidemiology* **89**, 435-448, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120956 (1969).
- 45 Polack, F. P. *et al.* A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *Journal of experimental medicine* **196**, 859-865, doi:10.1084/jem.20020781 (2002).
- 46 Melendi, G. A. *et al.* C5 modulates airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia during enhanced respiratory syncytial virus disease by decreasing C3a receptor expression. *Journal of virology* **81**, 991-999, doi:10.1128/jvi.01783-06 (2007).
- 47 Murphy, B. R. *et al.* Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. *Journal of clinical microbiology* **24**, 197-202, doi:10.1128/jcm.24.2.197-202.1986 (1986).
- 48 Killikelly, A. M., Kanekiyo, M. & Graham, B. S. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Scientific reports* **6**, 34108, doi:10.1038/srep34108 (2016).
- 49 Toltzis, P. 50 years ago in the journal of pediatrics: atypical exanthem after exposure to natural measles: eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine. *The journal of pediatrics* **193**, 84, doi:10.1016/j.jpeds.2017.12.036 (2018).

- 50 Halstead, S. B. Safety issues from a phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent dengue vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics* **14**, 2158-2162, doi:10.1080/21645515.2018.1445448 (2018).
- 51 Thomas, S. *et al.* Antibody-dependent enhancement (ADE) and the role of complement system in disease pathogenesis. *Molecular immunology* **152**, 172-182, doi:10.1016/j.molimm.2022.11.010 (2022).
- 52 Leroux-Roels, I. *et al.* Safety and immunogenicity of a revaccination with a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine in older adults: a phase 2b study. *The journal of infectious diseases* **229**, 355-366, doi:10.1093/infdis/jiad321 (2024).
- 53 Baber, J. *et al.* A phase 1/2 study of a respiratory syncytial virus prefusion F vaccine with and without adjuvant in healthy older adults. *The journal of infectious diseases* **226**, 2054-2063, doi:10.1093/infdis/jiac189 (2022).
- 54 Friedland, L. GSK's RSVPreF3 OA vaccine (AREXVY) : AREXVY was approved by FDA on May 3, 2023, and is indicated for the prevention of LRTD disease caused by RSV in adults 60 and older, as a single dose. *Centers for disease control and prevention* (2023).
- 55 Dieussaert, I. *et al.* RSV prefusion F protein-based maternal vaccine - Preterm birth and other outcomes. *The new england journal of medicine* **390**, 1009-1021, doi:10.1056/NEJMoa2305478 (2024).
- 56 Fleming-Dutra, K. E. *et al.* Use of the pfizer respiratory syncytial virus vaccine during pregnancy for the prevention of respiratory syncytial virus-associated lower respiratory tract disease in infants: recommendations of the advisory committee on immunization practices - United States, 2023. *Morbidity and mortality weekly report* **72**, 1115-1122, doi:10.15585/mmwr.mm7241e1 (2023).
- 57 McLellan, J. S. *et al.* Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science* **342**, 592-598, doi:10.1126/science.1243283 (2013).
- 58 Crank, M. C. *et al.* A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science* **365**, 505-509, doi:10.1126/science.aav9033 (2019).
- 59 Krarup, A. *et al.* A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nature communications* **6**, 8143, doi:10.1038/ncomms9143 (2015).
- 60 Stobart, C. C. *et al.* A live RSV vaccine with engineered thermostability is immunogenic in cotton rats despite high attenuation. *Nature communications* **7**, 13916, doi:10.1038/ncomms13916 (2016).
- 61 Calder, L. J. *et al.* Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* **271**, 122-131, doi:10.1006/viro.2000.0279 (2000).

- 62 Bolt, G., Pedersen, L. O. & Birkeslund, H. H. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus research* **68**, 25-33, doi:10.1016/s0168-1702(00)00149-0 (2000).
- 63 Krzyzaniak, M. A., Zumstein, M. T., Gerez, J. A., Picotti, P. & Helenius, A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *Plos pathogens* **9**, e1003309, doi:10.1371/journal.ppat.1003309 (2013).
- 64 Mas, V., Nair, H., Campbell, H., Melero, J. A. & Williams, T. C. Antigenic and sequence variability of the human respiratory syncytial virus F glycoprotein compared to related viruses in a comprehensive dataset. *Vaccine* **36**, 6660-6673, doi:10.1016/j.vaccine.2018.09.056 (2018).
- 65 Harshbarger, W. *et al.* Improved epitope resolution of the prefusion trimer-specific antibody AM14 bound to the RSV F glycoprotein. *mAbs* **13**, 1955812, doi:10.1080/19420862.2021.1955812 (2021).
- 66 McLellan, J. S., Yang, Y., Graham, B. S. & Kwong, P. D. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *Journal of virology* **85**, 7788-7796, doi:10.1128/jvi.00555-11 (2011).
- 67 Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design* **27**, 221-234, doi:10.1007/s10822-013-9644-8 (2013).
- 68 Li, J. *et al.* The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins* **79**, 2794-2812, doi:10.1002/prot.23106 (2011).
- 69 Beard, H., Cholleti, A., Pearlman, D., Sherman, W. & Loving, K. A. Applying physics-based scoring to calculate free energies of binding for single amino acid mutations in protein-protein complexes. *Plos one* **8**, e82849, doi:10.1371/journal.pone.0082849 (2013).
- 70 Rezende, W. *et al.* The efficiency of p27 cleavage during in vitro respiratory syncytial virus (RSV) infection is cell line and RSV subtype dependent. *Journal of virology* **97**, e0025423, doi:10.1128/jvi.00254-23 (2023).
- 71 アレックスビー筋注用に関する申請資料概要. 医薬品医療機器総合機構. .
- 72 Strickler, S. S. *et al.* Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry* **45**, 2761-2766, doi:10.1021/bi0600143 (2006).
- 73 Swanson, K. A. *et al.* A monomeric uncleaved respiratory syncytial virus F antigen retains prefusion-specific neutralizing epitopes. *Journal of virology* **88**, 11802-11810, doi:10.1128/jvi.01225-14 (2014).
- 74 Tian, D. *et al.* Structural basis of respiratory syncytial virus subtype-dependent neutralization by an antibody targeting the fusion glycoprotein. *Nature communications* **8**, 1877, doi:10.1038/s41467-017-01858-w (2017).

- 75 Jones, H. G. *et al.* Alternative conformations of a major antigenic site on RSV F. *Plos pathogens* **15**, e1007944, doi:10.1371/journal.ppat.1007944 (2019).
- 76 Gilman, M. S. A. *et al.* Transient opening of trimeric prefusion RSV F proteins. *Nature communications* **10**, 2105, doi:10.1038/s41467-019-09807-5 (2019).
- 77 Mousa, J. J., Kose, N., Matta, P., Gilchuk, P. & Crowe, J. E., Jr. A novel pre-fusion conformation-specific neutralizing epitope on the respiratory syncytial virus fusion protein. *Nature microbiology* **2**, 16271, doi:10.1038/nm microbiol.2016.271 (2017).
- 78 Gilman, M. S. *et al.* Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Science immunology* **1**, doi:10.1126/sciimmunol.aa j1879 (2016).
- 79 Ngwuta, J. O. *et al.* Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Science translational medicine* **7**, 309ra162, doi:10.1126/scitranslmed.aac4241 (2015).
- 80 Joyce, M. G. *et al.* Iterative structure-based improvement of a fusion-glycoprotein vaccine against RSV. *Nature structural & molecular biology* **23**, 811-820, doi:10.1038/nsmb.3267 (2016).
- 81 Martín, D., Calder, L. J., García-Barreno, B., Skehel, J. J. & Melero, J. A. Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *Journal of general virology* **87**, 1649-1658, doi:10.1099/vir.0.81715-0 (2006).
- 82 Taylor, G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* **35**, 469-480, doi:10.1016/j.vaccine.2016.11.054 (2017).
- 83 Guideline on the clinical evaluation of medicinal products indicated for the prophylaxis or treatment of respiratory syncytial virus (RSV) disease. *European medicines agency*, doi:EMA/CHMP/257022/2017 (2017).
- 84 Walsh, E. E., Peterson, D. R. & Falsey, A. R. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. *The journal of infectious diseases* **189**, 233-238, doi:10.1086/380907 (2004).
- 85 O'Brien, K. L. *et al.* Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet. Infectious diseases* **15**, 1398-1408, doi:10.1016/s1473-3099(15)00247-9 (2015).
- 86 Manolova, V. *et al.* Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology* **38**, 1404-1413, doi:10.1002/eji.200737984 (2008).
- 87 Zabel, F. *et al.* Viral particles drive rapid differentiation of memory B cells into secondary plasma cells producing increased levels of antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 5499-5508, doi:10.4049/jimmunol.1400065 (2014).

- 88 Ols, S. *et al.* Multivalent antigen display on nanoparticle immunogens increases B cell clonotype diversity and neutralization breadth to pneumoviruses. *Immunity* **56**, 2425-2441.e2414, doi:10.1016/j.jimmuni.2023.08.011 (2023).
- 89 Deffrasnes, C., Hamelin, M. E. & Boivin, G. Human metapneumovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **28**, 213-221, doi:10.1055/s-2007-976493 (2007).
- 90 Branche, A. R. & Falsey, A. R. Parainfluenza virus infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **37**, 538-554, doi:10.1055/s-0036-1584798 (2016).