

Title	Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors
Author(s)	瀬瀬, 律子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58208
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	額額(久保田) 律子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 24107 号
学位授与年月日	平成22年4月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors (インフルエンザウイルスに対して広域反応性を示すヒト型単クローン中和抗体のインフルエンザワクチン接種者からの単離)
論文審査委員	(主査) 教授 生田 和良 (副査) 教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

[目的]

インフルエンザウイルスが毎年世界中で流行を繰り返す主要因として、インフルエンザウイルスの膜蛋白であるヘマグルチニン(HA)の抗原変異が挙げられる。抗原変異の著しいインフルエンザウイルスHAの抗原性を解明することによりワクチン開発や予防あるいは治療薬開発に有用な情報が得られることが期待される。また、重症急性呼吸器症候群(SARS)、東南アジアを中心に鳥の間で流行しヒトにも感染して深刻な被害をもたらしている高病原性鳥インフルエンザにおいて、ウイルス感染者の回復期血清が患者の治療に有効であったことなど、臨床における抗体治療の効果が確認されている。近年、ファージディスプレイ法やSingle cell PCR法など、人工的にヒト型抗体を作製する技術が発展し、高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するヒト型単クローン抗体(HuMAbs)の報告が多くなされている。一方、季節性インフルエンザウイルスにおいては未だ報告が少ない。しかし、季節性インフルエンザウイルス感染においても高齢者や妊婦、基礎疾患を有するハイリスク群では重篤な症状を引き起こすことがあり、軽視は出来ない。そこで、ワクチン開発や予防あるいは治療薬開発を目的として、季節性インフルエンザワクチン接種者よりインフルエンザウイルスに対するHuMAbsを単離し、その性状を解析した。

[方法ならびに成績]

2006/07年シーズンのインフルエンザワクチンを接種した健常人5名より末梢血リンパ球を採取し、ヒトフュージョンプार्टナーであるSPYMEG細胞と細胞融合してハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ培養上清を同シーズンワクチンに含有されるインフルエンザウイルスA/New Caledonia/20/1999(H1N1)株、A/Hiroshima/52/2005(H3N2)株およびB/Malaysia/2506/2004株の精製HAを抗原としたELISA法で、インフルエンザウイルスに特異的なHuMAbsをスクリーニングした結果、抗H1抗体産生1クローン、抗H3抗体産生5クローン、抗B抗体産生4クローンの計10種類のHuMAbsを単離することが出来た。これらのHuMAbsは、感染細胞を抗原として

行った免疫蛍光抗体法あるいはウエスタンブロット法で、HA蛋白を認識していることが示唆された。

得られたHuMAbsについて赤血球凝集抑制(HI)試験、中和試験を行った結果、抗H1抗体はHI活性も中和活性も認められなかったが、抗H3抗体では5クローンのうち2クローン(B-1,D-1)でHI活性は検出されなかったものの強い中和活性が認められた。また、抗B抗体においては4クローンのうち2クローン(B-3,E-2)でHI活性はないが中程度の中和活性が認められた。過去のワクチン株に対する反応性の解析を行った結果、得られた抗H3 HuMAbsおよび抗B HuMAbsは同一亜型内で広域反応性を示した。

さらに、強い中和活性を示したB-1およびD-1抗体が認識しているエピトープをHA蛋白のHA1領域の合成ペプチドに対する反応性により解析した結果、B-1およびD-1抗体は、共に167-181、169-183、171-185、173-187の4ペプチドおよび225-239、227-241の2ペプチドに反応し、2箇所の領域を認識していた。この2箇所の領域は、HAの立体構造上で隣接していた。また、B-1およびD-1抗体の重鎖および軽鎖の相補性抗原決定領域(CDR)のアミノ酸配列を比較したところ、全く異なるアミノ酸配列であった。

[総括]

1) 2006/07年シーズンのインフルエンザワクチン接種者5名より、抗HI抗体産生1クローン、抗H3抗体産生5クローン、抗B抗体産生4クローンの計10種類のHuMAbsが単離出来た。2006/07年シーズンの我が国での主な流行株がAH3N2型とB型であったことから、この結果はヒトが暴露された可能性のあるウイルスを反映していると考えられた。

2) 単離された抗H3および抗B HuMAbsは、いずれも同一亜型内で広域反応性を示した。

3) 強い中和活性を示した2種類の広域反応性抗H3 HuMAbs、B-1およびD-1抗体は、それぞれ別のワクチン接種者から単離されたものであり、抗体の重鎖および軽鎖CDRのアミノ酸配列も異なっているにもかかわらず、全く同じHA1領域のエピトープを認識していた。この領域は、これまで報告された中和エピトープとは異なる領域で、新しい中和エピトープの可能性が高い。

以上の結果、AH3型インフルエンザウイルスに対して広域反応性を示すヒト型中和抗体が得られ、そのエピトープを明らかにしたことによってワクチン開発や予防あるいは治療薬開発に有用な情報が得られた。

論文審査の結果の要旨

毎年世界中で流行を繰り返すインフルエンザウイルスは、変異が著しく、ワクチンなどの予防薬やノイラミニダーゼ阻害剤などの抗インフルエンザ薬もその効果は完全なものではなく、副作用の出現も否定できない。高病原性インフルエンザのみならず季節性インフルエンザでも、特に感染すると重症化が懸念される免疫機能低下状態に有効な予防・治療薬の開発が重要と考えられる。本研究では、ウイルスの抗原変異に左右されず、免疫機能低下状態においても有効な予防・治療薬の開発に応用することを目的として、インフルエンザワクチン接種者より完全にヒト型の広域反応性抗インフルエンザウイルス抗体の単離を試みた。その結果、AH3亜型およびB型インフルエンザウイルスに対して亜型内で広域に反応する完全ヒト型単クローン中和抗体の単離に成功した。さらにAH3亜型ウイルスに対する中和抗体が認識しているエピトープを解析することによって、新規の保存性の高い中和エピトープを発見した。特に抗原変異の著しいAH3亜型インフルエンザウイルスのHA蛋白において、高度に保存されている新規エピトープを発見した功績は新たな予防および治療薬開発の可能性を見出した点において評価するにふさわしく、学位の授与に値すると思われる。