

ヒト抗体ライブラリーからの B型インフルエンザウイルス抗HA抗体単離の試み

平野 大介・大島 信子^{1,2}・吉田 俊治・黒澤 良和^{1,3}

(藤田保健衛生大学医学部・リウマチ・感染症内科学教室)

(¹藤田保健衛生大学研究支援推進センター・最先端医療イノベーション部門)

(²藤田保健衛生大学産学連携推進センター)

(³藤田保健衛生大学総合医科学研究所・寄附研究部門・最先端医療イノベーション学)

1. 緒 言

インフルエンザは、インフルエンザウイルスによって起こる感染症である。高齢者など高リスク患者においては肺炎を併発し、多くの死亡をもたらす。原因となるインフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、核タンパクおよびマトリックスタンパクの抗原性の違いからA、B、Cの3つの型に分類されている。この中でA型とB型ウイルスが季節性インフルエンザとしてヒトに流行をもたらす。

B型インフルエンザは、一般にA型インフルエンザよりも合併症が少なく、軽症のことが多いとされている。しかし、ライ症候群や筋炎の合併はB型インフルエンザに多く、ノイラミニダーゼ阻害薬の効果がA型インフルエンザに比較して低いとの報告もあり、注意が必要である¹。

A型ウイルスは膜上の糖タンパクであるヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)の抗原性の違いにより亜型に細分化されている。一方、B型ウイルスはA型のように亜型の存在はないが、HA遺伝子の分子系統的解析によりYamagata系統とVictoria系統に分類され、HAの抗原性が異なる。HAには毎年変異が導入されるものの、その導入率はA型ウイルスより低い。B型ウイルスはA型と異なりヒトのみを宿主としているため、パンデミックが予想されておらず、世界的にみてもB型ウイルスに対する中和抗体の研究はA型ウイルスより遅れている。

インフルエンザワクチンの主な作用機序はHAに対する中和抗体を誘導することである。HAはインフルエンザウイルスが宿主に感染するために必須の膜上に存在する糖タンパクである。HA頭部には宿主に結合するためのレセプター結合領域が存在し、その領域周辺は抗原性が高く中和抗体が誘導されやすい部位であ

るが、変異が導入されやすい。一方、HA幹部領域は変異が導入されにくく、HA亜型間でアミノ酸配列の保存度が高い。そのためHA幹部に対する中和抗体を誘導できるワクチンは、亜型間を超えて中和活性をもつユニバーサルワクチンとなる可能性をもっている³。

我々は、これまでの研究においてファージディスプレイ法により作製したファージ抗体ライブラリーから200種類以上のA型インフルエンザウイルスの抗HA抗体を単離し、レパートリー解析をしてきた⁴⁻⁶。

本研究では、B型インフルエンザウイルスの抗HA抗体を多数単離することを目的とした。

2. 実験方法

2-1. ドナーおよびワクチン接種スケジュール

ドナーは1947年に生まれ、小児期および1968年にインフルエンザに何度か罹患した。ドナーは2009年にA型のA/California/7/2009(H1N1)のワクチン接種を受ける前にはインフルエンザワクチン接種歴はなかった。

本研究では、2014年4月に2週間間隔で2回のワクチン接種を行い、2回目ワクチン接種の1か月後に末梢血を採取した。接種した季節性インフルエンザワクチンは2013/2014シーズンのB/Massachusetts/2/2012(Yamagata系)、A/Texas/50/2012(H3N2)およびA/California/7/2009(H1N1)であった。

本研究は、藤田保健衛生大学倫理委員会で承認され、ドナーには書面で同意を取得した。

2-2. ヒト抗体ライブラリーの作製

ファージディスプレイ法を用いてヒト抗体ライブラリーを作製した⁷。200ml末梢血から 1.68×10^8 個のBリンパ球を含む単核球を回収し、messenger RNAを単

離後, complementary DNA を合成した。抗体 V 遺伝子を PCR 法にて増幅し, 重鎖と軽鎖のライブラリーをそれぞれ作製した。重鎖ライブラリーから重鎖を切り出し, 軽鎖ライブラリーに重鎖を挿入することで 2.18×10^9 サイズのヒト抗体ライブラリーを作製した (図 1)。

2-3. ウイルス株

スクリーニングおよび ELISA には, 以下の阪大微生物病研究会より分与していただいたホルマリン処理された B 型インフルエンザ HA ワクチン液を使用した。B/Massachusetts/2/2012, B/Brisbane/60/2008。

2-4. ヒト抗体ライブラリーのスクリーニング

作製したヒト抗体ライブラリーを, パニング法によってスクリーニングした。B/Massachusetts/2/2012 および B/Brisbane/60/2008 株のホルマリン処理された B 型インフルエンザ HA ワクチン液を希釈して抗原として使用した。2 回または 3 回パニングした後, 溶出したファージを大腸菌 (DH12S) に感染させ, アンピ

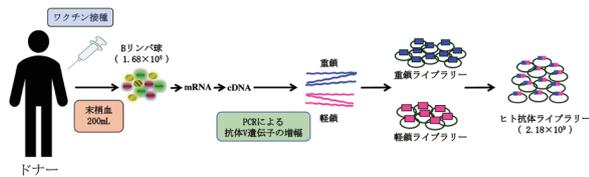


図 1 ヒト抗体ライブラリーの作製

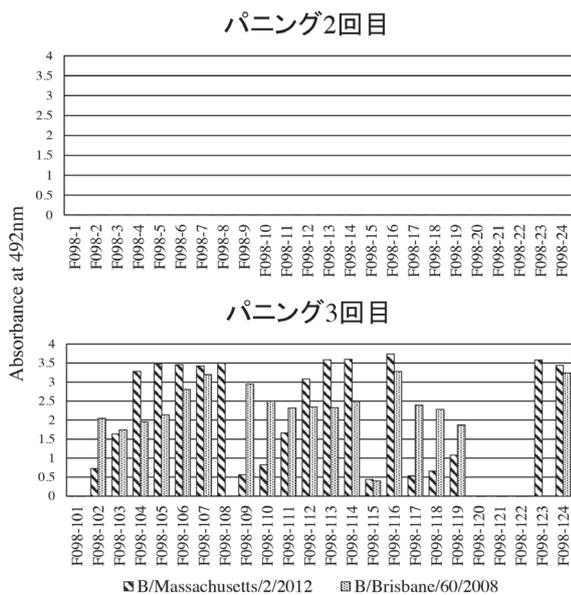


図 2 B/Massachusetts/2/2012 でのスクリーニング (F098) で単離した抗体の結合活性
ELISA で 492nm の吸光度を測定した。抗原には B/Massachusetts/2/2012 および B/Brisbane/60/2008 のウイルス株を使用した。上段には 2 回目のパニングで単離した抗体の結合活性を, 下段には 3 回目のパニングで単離した抗体の結合活性を示す。

シリン耐性 LB 寒天プレートに播種した。プレートからそれぞれ 24 個ずつ大腸菌コロニーを選出した。大腸菌コロニーを 1 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含有する 2 × YT 培地中で 30°C にて一晩培養し, Fab 型抗体を培地中に分泌させた。Fab 型抗体は, Fab に M13 ファージコードタンパクである g3p を融合させた形 (Fab - cp3 型) で発現させた。

2-5. 核タンパク (NP) の調製

人工合成した B/Brisbane/60/2008 の NP (accession No. Y115154) 遺伝子を, pET-21d(+) ベクターに挿入した。大腸菌 BL21(DE3)plysS に導入し, 1 mM IPTG 含有の 2 × YT 培地中で 20°C で一晩培養し, 大腸菌内に NP を発現させた。大腸菌を凍結融解後, 遠心分離により NP を含む上清を回収した。

2-6. ELISA

ホルマリン処理された B 型インフルエンザ HA ワクチン液もしくは大腸菌で発現させた NP を 96 ウェル Maxisorp イムノプレート上にコーティングした。5% ウシ血清アルブミンでブロッキング後, 大腸菌培養上清中の Fab-cp3 型抗体を各ウェルに加え, 反応させた。ウェルの洗浄後, マウス抗 cp3 抗体 (MBL) を加え, 反応させた。その後, 西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H + L) (MBL) を加え, 反応させた。HRP の基質 (O-フェニレンジアミン二塩酸塩; Wako) を各ウェルに加え, 発色させた後, H₂SO₄ で反応を停止させ, 492nm の吸光度を測定した。

3. 実験結果

季節性インフルエンザワクチン接種後のドナーの末梢血より作製したヒト抗体ライブラリーを, B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) および B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) のホルマリン処理された B 型インフルエンザ HA ワクチン液を用いてパニング法でスクリーニングを行った。2 回または 3 回パニングした後に各 24 抗体ずつ単離した。それら抗体の B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) および B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) のホルマリン処理された B 型インフルエンザ HA ワクチン液に対する結合活性を ELISA で確認した。

B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) でのスクリーニング (F098) では, B 型ワクチン液に対し結合活性の持つ抗体を 18 個単離した。結合活性データを図 2 に示す。F098 では 2 回目のパニングでは結合活性のある抗体は単離できなかったが 3 回パニングを行

うことにより、18 個の抗体の単離が可能となった。これは、2 回のパニングでは B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) 株に対し結合活性を有する抗体群の濃縮が十分ではなかったためと考えられる。単離した抗体のうち、F098-108, F098-123 の 2 つの抗体は B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) のみに結合活性を示した。それ以外の 16 個の抗体は B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) と B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) の両方に結合活性を示した。

B/Brisbane60/2008 (Victoria 系統) でのスクリーニング (F108) では、2 回目及び 3 回目のパニングから、活性が弱いながらも、13 個の B 型ワクチン液に対する結合活性を持つ抗体を単離した。結合活性データを図 3 に示す。13 個の抗体すべてが、B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) と B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) の両方に結合活性を示した。

我々がこれまでに実施してきた A 型インフルエンザワクチン液でのスクリーニングで単離した抗体の中で、異なる亜型間 (H3 型と H1 型) の両方に結合活性を示す抗体は抗 NP 抗体が大多数であり、抗 HA 抗体は数個単離できたに過ぎない。B 型においても同様のことが起こると考え、抗 NP 抗体を効率的に除くため、大腸菌発現系を用いて B 型インフルエンザウイルス (B/Brisbane/60/2008) の NP を作製し、今回単離した抗体の NP に対する結合活性を ELISA で確認した。NP への結合活性データを図 4 に示す。F098-108, F098-123, F098-112 以外の全ての抗体が NP に対して結合活性を示した。

4. 考 察

本研究で単離したクローンのうち、両系統の B 型インフルエンザワクチン液に結合活性を示す抗体はほとんど抗 NP 抗体であったが 1 抗体のみ NP に対して結合活性を示さなかった。両系統のワクチン液に交差反応する抗体の中からこのような抗体の存在を簡便に確認するために、NP の大腸菌での発現系を導入した。これは、NP には糖鎖がないことから大腸菌での発現系を構築することが可能であるためであり、簡便に NP を調製し、かつ ELISA での実験系に持ち込むことが容易となる。インフルエンザワクチン液でのスクリーニングでは、異なる亜型 (A 型) 及び異なる系統 (B 型) のワクチン液に交差反応性を持つ抗体が多数単離されることも多いことから、この実験系は大いに威力発揮すると思われる。

本研究では最終的に B 型ウイルスの抗 HA 抗体を多数単離することが目的である。これまでの我々の研究においては抗 HA 抗体、抗 NP 抗体の単離率が高く、

ワクチン液とライブラリーの組み合わせによっては抗 NP 抗体ばかりが単離され、目的とする抗 HA 抗体が単離できない場合も多い。これは、インフルエンザ HA ワクチンの原液の調製は、HA 画分の精製を行っているものの、実際にはノイラミニダーゼ、マトリックス (M1) タンパク、NP などほかのウイルス構成タンパクが含まれていることに起因すると考えられる。そのため、今後は中和活性を持つ抗 HA 抗体をヒト抗体ライブラリーより効率的に単離する方法を検討する必要がある。その一つの手段として、ヒト抗体ライブラリー中に存在する抗 NP 抗体を、本研究で作成した B 型ウイルスの NP とあらかじめ反応させておいた状態でスクリーニングを実施することを考えている。その結果、抗 NP 抗体の単離数が減少し、抗 HA 抗体の単離

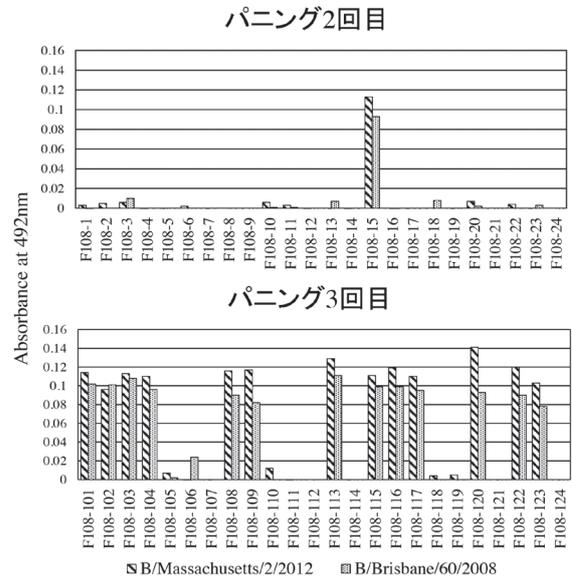


図 3 B/Brisbane/60/2008 でのスクリーニング (F108) で単離した抗体の結合活性
ELISA で 492nm の吸光度を測定した。抗原には B/Massachusetts/2/2012 および B/Brisbane/60/2008 のウイルス株を使用した。上段には 2 回目のパニングで単離した抗体の結合活性を、下段には 3 回目のパニングで単離した抗体の結合活性を示す。

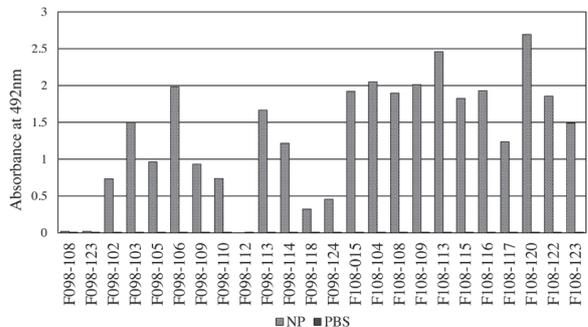


図 4 核タンパク (NP) に対する結合活性
B 型インフルエンザウイルス株に結合活性を示した抗体を ELISA で 492nm の吸光度を測定した。抗原には NP (B/Brisbane/60/2008 株) を使用した。バックグラウンドとして PBS (リン酸緩衝生理食塩水) を使用した。

数が上昇することを期待している。

本研究で単離した抗体 F098-108, F098-123, F098-112 は, NP に結合活性を示さなかったことから抗 HA 抗体である可能性が考えられた。そのうち F098-108, F098-123 は, 今回接種したワクチンに含まれていた B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) 株に対してのみ結合活性を示した。しかし, この株だけではなくそれ以前に流行した Yamagata 系統のウイルス株にも交差反応する可能性があり, 今後検討が必要である。F098-112 は B/Massachusetts/2/2012 (Yamagata 系統) と B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) の両方に結合活性を示した。Yamagata 系統と Victoria 系統の両方に交叉反応を示す抗 HA 抗体は少数しか報告されていない。^{8,9} F098-112 についても Yamagata 系統と Victoria 系統の両方に交叉反応を示す抗 HA 抗体の可能性があり, スクリーニング方法の改善によってこのような抗体のさらなる単離が期待できる。

今回単離した 3 個の抗体 F098-108, F098-112, F098-123 は, ウェスタンブロット法による抗原の決定や赤血球凝集抑制試験での抗体作用機序の確認, 同一系統内のウイルス株 (抗原変異株) に対する交差反応性, および抗体のアミノ酸配列の解析が今後の課題である。

5. 結 論

ヒト抗体ライブラリーを作成しスクリーニングを実施した結果, B 型インフルエンザウイルスに対し結合活性をもつ Fab 型抗体を 3 個単離した。F098-108, F098-123, F098-112 は NP に対する結合活性を示さないことから, 抗 HA 抗体である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Burnham AJ, Baranovich T, and Govorkova EA : Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection : efficacy and resistance. *Antiviral Res.* 2013 ; 100 : 520 – 534.
- 2) Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, and Nerome K : Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology.* 1990 ; 175 : 59 – 68.
- 3) Thomson CA, Wang Y, Jackson LM, Olson M, Wang W, Liavonchanka A, Keleta L, Silva V, Diederich S, Jones RB, Gubbay J, Pasick J, Petric M, Jean F, Allen VG, Brown EG, Rini JM, and Schrader JW : Pandemic H1N1 Influenza Infection and Vaccination in Humans Induces Cross-Protective Antibodies that Target the Hemagglutinin Stem. *Front. Immunol.* 2012 ; 3 : 87.
- 4) Okada J, Ohshima N, Iba Y, Kubota-Koketsu R, Ota S, Takase W, Azuma M, Iba Y, Nakagawa N, Yoshikawa T, Najima Y, Ishikawa T, Asano Y, Okuno Y, and Kurosawa Y : Monoclonal antibodies in man that neutralized H3N2 influenza viruses were classified into three groups with distinct train specificity : 1968 – 1973, 1977 – 1993, 1997 – 2003. *Virology.* 2010 ; 397 : 322 – 330.
- 5) Ohshima N, Iba Y, Kubota-Koketsu R, Asano Y, Okuno Y, Asano Y, and Kurosawa Y : Naturally occurring antibodies in humans can neutralize a variety of influenza virus strains, including H3, H1, H2, and H5. *J. Virol.* 2011 ; 85 : 11048 – 11057.
- 6) Ohshima N, Kubota-Koketsu R, Iba Y, Okuno Y, Asano Y, and Kurosawa Y : Two types of antibodies are induced by vaccination with A/California/2009pdm Virus : Binding near the sialic Acid-binding pocket and Neutralizing both H1N1 and H5N1 Viruses. *PLoS One.* 2014 ; 9 : e87305.
- 7) Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, and Hoogenboom HR. : Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994 ; 12 : 433 – 455.
- 8) Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, and Ikuta K : Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Path.* 2013 ; 9 : e1003150.
- 9) Chai N, Swem LR, Park S, Nakamura G, Chiang N, Estevez A, Fong R, Kamen L, Kho E, Reichelt M, Lin Z, Chiu H, Skippington E, Modrusan Z, Stinson J, Xu M, Lupardus P, Ciferri C, and Tan MW : A broadly protective therapeutic antibody against influenza B virus with two mechanisms of action. *Nat. Commun.* 2017 ; 8 : 14234.
- 10) Dudas G, Bedford T, Lycett S, and Rambaut A : Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1-PB2-HA Gene Complex. *Mol. Biol. Evol.* 2015 ; 32 : 162 – 172.

(平成 29 年 9 月 13 日受理)