

氏名	いり え たかし 入 江 崇
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 509 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	狂 犬 病 曝 露 後 の 発 症 予 防 的 治 療 用 製 剤 と し て の 抗 G モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 探 索 と そ の 特 性

論文調査委員 (主 査)
教 授 河 合 明 彦 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルスは、非分節型の(-)鎖RNAをゲノムとして有するモノネガウイルス属に属するラブドウイルス科のウイルスである。そのゲノム中には、ヌクレオプロテイン(N)、フォスフォプロテイン(P)、マトリクスプロテイン(M)、ウイルス糖タンパク質(G)、RNAポリメラーゼ活性を有するラージプロテイン(L)の5つのウイルスタンパクがモノシストロニックにコードされている。Nタンパクは、RNAゲノムと結合してカプジドを形成し、これにL及びPタンパクが結合してRNP複合体を形成する。このRNP複合体は、細胞膜由来の脂質二重膜により包み込まれ、この膜を貫通するGタンパク及びそれを裏打ちするMタンパクにより、特徴的な砲弾型のウイルス粒子が形成される。

狂犬病ウイルスは、ほとんど全ての哺乳動物に向神経性に感染し、神経病原性を示す。通常、感染動物の唾液腺で増殖したウイルスが口腔中に排出されており、ヒトへの感染は、ほとんどが感染動物による咬傷より起こる。狂犬病の感染は不活化ワクチンの接種により有効に予防することが可能であるが、発症後の治療法は未だ確立されておらず、発症後の致死率はほぼ100%であり、特に東南アジア、インドなどでは日常的に死亡例が報告されている。現在ウイルス曝露後の発病予防には、ワクチン接種、抗血清による受動免疫の獲得などが行われているが、感染後の接種時期が限られ、また異種抗体によるアレルギーや、抗体価が安定しないこと、高コストなどが問題点として残されている。

現在、上記の問題点を改善した曝露後の発病予防的治療用製剤として、三種類の異なる抗Gモノクローナル抗体を混合したものが提案されている。本研究では、この候補としての強力な中和抗体価を示す抗Gモノクローナル抗体を探索し、その特性について検討を行った。

第一章狂犬病ウイルスに対して高い中和作用を示す抗Gモノクローナル抗体の探索とエピトープマッピング

狂犬病ウイルスでは、ウイルス粒子表面に露呈しているGタンパクが抗体による中和の主なターゲットになる。当研究室では、狂犬病ウイルスHEP-Flury株を抗原とし、12種類の抗Gモノクローナル抗体を調製しており、そのうちのひとつ(#7-1-9)を除き、全てGタンパクのコンフォメーション依存的なエピトープを認識した。これらの抗体は、同一濃度で幅広い異なる中和抗体価を示し、最も中和抗体価の高い#1-46-12と最も低い#7-1-9の間では、抗体価に223倍の差がみられた。また、6種類の狂犬病ウイルス株に対する反応性を調べたところ、#1-46-12及び#1-76-11のみが全ての株に反応性を示した。このような#1-46-12の特徴から、この抗体の曝露後発症予防用製剤としての応用の可能性について検討するため、以下のようにさらに詳細な解析を行った。

HEP-Flury株を親株として#1-46-12に対する中和抵抗性変異体を分離したところ、単一のアミノ酸変異により分類される2種類が得られた。すなわち、Gタンパク上の36位(T36P)又は39位(S39T)にアミノ酸置換があり、以下の実験では、それぞれの代表的なクローンとしてR-31及びR-61を用いた。これらのうちR-31は、#1-46-12エピトープを完全に喪失しており、Gタンパクの36位周辺領域が#1-46-12エピトープを形成していることが示された。このエピトープ形成部位のアミノ酸配列を、これまでに報告されている狂犬病ウイルス街上市毒及び実験室株と比較したところ、非常に高い保存性

が示された。この結果を反映し、#1-46-12は他の調べた実験室株全てに対して同程度の強力な中和活性を示した。

第二章 #7-1-9及び#1-46-12のウイルス中和活性の化学量論的比較

#1-46-12及び#7-1-9でみられた大きな中和抗体価の差は、各抗体の結合親和性（結合定数）の差によるものであるかどうかを調べた。しかし、両抗体のHEP株に対する結合定数は約 $6 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ で、等しい値を示した。また、両抗体のウイルス粒子に対する経時的な結合性にもほとんど差はみられなかった。これらの結果から、両抗体の中和抗体価の差は、その結合親和性の違いによるものではないことが示された。

抗体によるウイルスの中和は良く知られた現象であり、一般に一定数以上の抗体分子の結合により物理的にウイルス粒子表面が覆われることにより達成されると考えられており、（中和に必要なIgG結合数） $= 0.0033 \times (\text{ウイルス粒子表面積})$ の式により一般化される。狂犬病ウイルスでは、抗Gモノクローナル抗体による中和について詳細な研究がなされており、1-1/e（約63%）の中和には、この式に合致するウイルス粒子あたり約225個のIgGの結合が必要であることが報告されている。#7-1-9はこれに合致し、63%の中和には約250個のIgG（全スパイクの56%）の結合が必要であった。これに対し#1-46-12の場合、最大でも20個程度のIgG（全スパイクの4%）の結合により同様の中和が達成されることが明らかになった。このことは、従来とは異なる中和機構の存在を示唆するものである。

さらに、#1-46-12及び#7-1-9は飽和結合条件下で、それぞれウイルス粒子あたり707及び770個のIgGが結合した。ウイルス粒子表面には、約1350個のGタンパクが存在することから、両抗体ともに二価で結合していると考えられた。

第三章 #1-46-12によるウイルス中和機構の解明

#1-46-12は、非常に少数の抗体のウイルス粒子への結合により、効率良くウイルスを中和できることが明らかとなった。この中和機構について解明するために、まず、#1-46-12及び#7-1-9によるウイルス感染における阻害段階を検討したところ、吸着率の抑制と中和率の間に同様の直線的関係が示され、いずれの抗体も吸着段階を阻害することが示された。

前述の2種類の中和抵抗性変異体のうち、R-31は#1-46-12エピトープを喪失することにより抵抗性を獲得していた。しかし一方のR-61はそのエピトープを保持しており、#1-46-12との結合定数も親株とほとんど同一であるにも関わらず、R-31と同程度の強い抵抗性を示し、さらに300個以上のIgGの結合によってもほとんど中和されなかった。このことから、感受性のウイルスは#1-46-12の結合によりレセプター結合能を喪失するが、その仕組みとして、抗体の結合がGタンパクのレセプター結合部位を物理的に障害するという可能性が否定された。また、狂犬病ウイルスGタンパクの37位には、株間で非常に高度に保存されているにも関わらずほとんど修飾を受けないN型糖鎖付加シグナル配列が存在する。R-61株は、S39T変異によりこの部位の修飾効率が著しく上昇しており、この糖鎖付加もしくは変異そのものにより#1-46-12の結合により抵抗性を獲得していると考えられる。

さらに、R-31と親株を同時感染させた細胞から得られたウイルスの#1-46-12に対する感受性を調べたところ、抗体感受性の親株由来のGタンパクの割合の増加に相関して子孫ウイルスの感受性が徐々に増大した。一方R-61と親株の場合、R-61に対して親株由来のGタンパクの割合が比較的低い場合でも、急激な抵抗性の喪失がみられた。これらの結果から、感受性ウイルスの場合、少量の#1-46-12の結合により、抗体の結合を受けたスパイクのみでなく、レセプター結合能を喪失するような構造変化がウイルス粒子全体のスパイクに何らかの機構で波及的に広がり、中和が達成されることが考えられる。またR-61の場合には、直接抗体の結合を受けた場合の変化には抵抗性を示すものの、感受性のGタンパクに抗体が結合して誘導される波及的効果を受けやすいが、R-31はその効果を受けにくいと考えられる。

狂犬病ウイルスのGタンパクは、pH依存的な変化に伴い構造が変化し、これに伴い、エピトープ構造、プロテアーゼに対する感受性などが変化することが知られている。#1-46-12の結合により誘導されると想定される変化について検討するために、#1-46-12結合後の、抗Gモノクローナル抗体の反応性の変化やいくつかのプロテアーゼに対する感受性の変化について検討したが、調べた範囲では変化がみられなかった。このことから、想定される構造変化は、Gタンパクの比較的限られた部位での変化であることが示唆された。

本研究により、#1-46-12は、ウイルス粒子への非常に少数の抗体分子の結合により宿主細胞への吸着能を効率良く抑制することができることが明らかとなり、この中和機構はこれまでに知られているものとは異なるものである可能性が強く示唆された。また、この抗体の高い中和抗体価、幅広いスペクトルなどは、その効果だけでなく、製造コストやモノクローナ

ル抗体を使用することによる効果の安定性などの点から、新しい狂犬病曝露後の発症予防的治療用製剤への利用に最適であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

狂犬病発症後の治療法は存在せず、ウイルス曝露後のワクチン接種及び抗血清の投与が、発症予防を目的として行われている。しかし、抗血清の使用にはいくつかの問題点が存在し、抗血清の代わりにウイルス中和活性をもつ三種類のモノクローナル抗体を組み合わせて使用することが、WHOにより提案されているが、未だ有効な抗体は見いだされていない。本論文は、この候補となるモノクローナル抗体を探索し、その基本的性質及びウイルス中和機構について解析を行ったものである。

狂犬病ウイルスでは、ウイルス粒子表面に露呈しているウイルス糖タンパク質（Gタンパク）が抗体による中和の主なターゲットになる。当研究室では、狂犬病ウイルス HEP-Flury 株を抗原とし、12種類の抗Gモノクローナル抗体を調製しており、そのうちのひとつ（#7-1-9）を除き、全てGタンパクのコンフォメーション依存的なエピトープを認識した。これらの抗体は、同一濃度で幅広い異なる中和抗体価を示し、最も中和抗体価の高い#1-46-12と最も低い#7-1-9の間では、抗体価に223倍の差がみられた。また、6種類の狂犬病ウイルス株に対する反応性を調べたところ、#1-46-12及び#1-76-11のみが全ての株に反応性を示した。このような#1-46-12の特徴から、この抗体の曝露後発症予防用製剤としての応用の可能性について検討するため、以下のようにさらに詳細な解析が行われた。

HEP-Flury 株を親株として#1-46-12に対する中和抵抗性変異体を分離したところ、単一のアミノ酸変異により分類される2種類が得られた。すなわち、Gタンパク上の36位（T36P）又は39位（S39T）にアミノ酸置換があり、以下の実験では、それぞれの代表的なクローンとしてR-31及びR-61を用いた。これらのうちR-31は、#1-46-12エピトープを完全に喪失しており、Gタンパクの36位周辺領域が#1-46-12エピトープを形成していることが示された。このエピトープ形成部位のアミノ酸配列を、これまでに報告されている狂犬病ウイルス街上毒及び実験室株と比較したところ、非常に高い保存性が示された。この結果を反映し、#1-46-12は他の調べた実験室株全てに対して同程度の強力な中和活性を示した。

#1-46-12及び#7-1-9でみられた大きな中和抗体価の差は、各抗体の結合親和性（結合定数）の差によるものであるかどうかを調べた。しかし、両抗体のHEP株に対する結合定数は約 $6 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ で、等しい値を示した。また、両抗体のウイルス粒子に対する経時的な結合性にもほとんど差はみられなかった。これらの結果から、両抗体の中和抗体価の差は、その結合親和性の違いによるものではないことが示された。

抗体によるウイルスの中和は良く知られた現象であり、一般に一定数以上の抗体分子の結合により物理的にウイルス粒子表面が覆われることにより達成されると考えられており、（中和に必要なIgG結合数） $= 0.0033 \times (\text{ウイルス粒子表面積})$ の式により一般化される。狂犬病ウイルスでは、抗Gモノクローナル抗体による中和について詳細な研究がなされており、1-1/e（約63%）の中和には、この式に合致するウイルス粒子あたり約225個のIgGの結合が必要であることが報告されている。#7-1-9はこれに合致し、63%の中和には約250個のIgG（全スパイクの56%）の結合が必要であった。これに対し#1-46-12の場合、最大でも20個程度のIgG（全スパイクの4%）の結合により同様の中和が達成されることが明らかになった。このことは、従来とは異なる中和機構の存在を示唆するものである。

さらに、#1-46-12及び#7-1-9は飽和結合条件下で、それぞれウイルス粒子あたり707及び770個のIgGが結合した。ウイルス粒子表面には、約1350個のGタンパクが存在することから、両抗体ともに二価で結合していると考えられた。

#1-46-12は、非常に少数の抗体のウイルス粒子への結合により、効率良くウイルスを中和できることが明らかとなった。この中和機構について解明するために、まず、#1-46-12及び#7-1-9によるウイルス感染における阻害段階を検討したところ、吸着率の抑制と中和率の間に同様の直線的関係が示され、いずれの抗体も吸着段階を阻害することが示された。

前述の2種類の中和抵抗性変異体のうち、R-31は#1-46-12エピトープを喪失することにより抵抗性を獲得していた。しかし一方のR-61はそのエピトープを保持しており、#1-46-12との結合定数も親株とほとんど同一であるにも関わらず、R-31と同程度の強い抵抗性を示し、さらに300個以上のIgGの結合によってもほとんど中和されなかった。このことから、感受性のウイルスは#1-46-12の結合によりレセプター結合能を喪失するが、その仕組みとして、抗体の結合がGタンパ

クのレセプター結合部位を物理的に障害するという可能性が否定された。また、狂犬病ウイルス G タンパクの37位には、株間で非常に高度に保存されているにも関わらずほとんど修飾を受けない N 型糖鎖付加シグナル配列が存在する。R-61 株は、S39T 変異によりこの部位の修飾効率が著しく上昇しており、この糖鎖付加もしくは変異そのものにより #1-46-12 の結合により抵抗性を獲得していると考えられる。

さらに、R-31 と親株を同時感染させた細胞から得られたウイルスの #1-46-12 に対する感受性を調べたところ、抗体感受性の親株由来の G タンパクの割合の増加に相関して子孫ウイルスの感受性が徐々に増大した。一方 R-61 と親株の場合、R-61 に対して親株由来の G タンパクの割合が比較的低い場合でも、急激な抵抗性の喪失がみられた。これらの結果から、感受性ウイルスの場合、少量の #1-46-12 の結合により、抗体の結合を受けたスパイクのみでなく、レセプター結合能を喪失するような構造変化がウイルス粒子全体のスパイクに何らかの機構で波及的に広がり、中和が達成されることが考えられる。また R-61 の場合には、直接抗体の結合を受けた場合の変化には抵抗性を示すものの、感受性の G タンパクに抗体が結合して誘導される波及的効果を受けやすいが、R-31 はその効果を受けにくいと考えられる。

狂犬病ウイルスの G タンパクは、pH 依存的な変化に伴い構造が変化し、これに伴い、エピトープ構造、プロテアーゼに対する感受性などが変化することが知られている。#146-12 の結合により誘導されると想定される変化について検討するために、#1-46-12 結合後の、抗 G モノクローナル抗体の反応性の変化やいくつかのプロテアーゼに対する感受性の変化について検討したが、調べた範囲では変化がみられなかった。このことから、想定される構造変化は、各 G タンパク分子上の比較的限られた部位での変化であることが示唆された。

以上、本研究で見いだされた #146-12 抗体は、モノクローナル抗体を用いた新しい狂犬病曝露後の発症予防用製剤への応用に適した性質を有しており、このような製剤の開発において貢献し得るものである。また、少量の抗体分子の作用によるウイルス中和機構は、特にエンベロープウイルスではほとんど明らかにされておらず、このような中和機構の一つとして、重要な情報を与えるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月27日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果、優秀と認定した。