

氏名	クリット チラパンメーデー Krit Thirapanmethee
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第565号
学位授与の日付	平成17年3月23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	狂犬病ウイルス糖タンパク質の構造的成熟についての基礎的、応用的研究
論文調査委員	(主査) 教授河合明彦 教授川寄敏祐 教授伊藤信行

論文内容の要旨

狂犬病ウイルス(RV)は、非分節型マイナス鎖RNAをゲノムとする被膜ウイルスであり、ラブドウイルス科リッサウイルス属に属している。RV粒子のエンベロープ膜には、単一のI型糖タンパク質(G)(65キログルトン)が組込まれている。ウイルスGタンパク質は粗面小胞体(rER)で合成され、非共有結合三量体を形成して、ゴルジ装置に輸送される。そこでさらにプロセッシングを受けて、成熟し、細胞表面に輸送される。狂犬病ウイルスを感染させた細胞では、Gタンパク質の一部(約10%)は培地へ可溶性の形(Gsと呼ばれている)で放出され、粒子には組み込まれない。Gsタンパク質は動物に対して免疫原性を欠くことが知られている。Gタンパク質の抗原構造として主要な抗原性サイトⅡとⅢ、マイナーサイトa、および数個の離れたエピトープが報告されている。このほかに、抗Gモノクローナル抗体(mAb) #1-30-44が認識するユニークなエピトープは202位および336位の離れた2つのアミノ酸を含む領域によって形成され、酸性条件下での構造変換により失われる。この1-30-44エピトープを形成する構造に成熟することは、レセプター認識、膜融合というGタンパク質本来の機能を担う上で不可欠である。本研究では、コンホーメーションナルエピトープ1-30-44について様々の観点から研究した。まず、可溶性Gsタンパク質の抗原構造を調べた。またG cDNAをトランスフェクトした動物細胞における1-30-44エピトープ形成を指標として、Gタンパク分子の成熟に必要な構造的条件を探索した。次に、狂犬病ウイルスGタンパク質の1-30-44エピトープの有無と免疫原性との関係を調べた。最後に、1-30-44抗体を用いてELISA法による狂犬病ワクチンの品質管理方法の開発を試みた。

第1章 G cDNAをトランスフェクトした動物細胞を用いてのGタンパク質の1-30-44エピトープ形成に必要な構造的条件の検討

この章では、当研究室のいくつかの高次構造特異的な抗G mAbを用いてGおよびGsタンパク質の抗原性を調べた。Gsタンパク質はmAb #1-30-44以外のすべてのmAbによって認識された。筆者は次にC-末端を欠損した2つのG変異体(GΔCTとGΔC)の1-30-44エピトープ形成を調べた。膜貫通(TM)領域全体および細胞質内領域の両方を欠いたGΔTC変異体は1-30-44エピトープを形成せず、発現細胞の表面に輸送されず、また細胞外にも放出されなかった。一方、GΔC変異体(これは細胞質側の44アミノ酸のうちC-末端から43アミノ酸を欠く)は、細胞表面へ輸送され、1-30-44エピトープに特異的なmAbに対して抗原性を示した。これらの結果から、1)Gsタンパク質は細胞表面に輸送された成熟Gタンパク質が切断を受けて放出されることが示唆された。また、2)膜貫通領域がGタンパク質の正確なフォルディングおよび輸送にとって、さらに1-30-44エピトープをもつ成熟した構造を維持するのにも不可欠であることが示唆された。また、3)1-30-44エピトープをもつ構造を維持することが免疫原性を発揮するのに重要であることが示唆された。

第2章 狂犬病ウイルスGタンパク質の1-30-44エピトープをもつ立体構造をとることと免疫原性との関連性

本章では、狂犬病ウイルスGタンパク質の1-30-44エピトープを形成し、維持することが免疫原性を発揮する上で重

要であるかどうかについて検討した。第1章の中で示されたように、Gsタンパク質は免疫原性を欠くと同時に1-30-44エピトープも欠如した。したがって、筆者は、1-30-44エピトープが狂犬病ウイルス糖タンパク質(G)の免疫原性にとっても不可欠かもしれないと仮定した。まず、ベータプロピオラクトン(BPL)で不活性化した市販の狂犬病ワクチン(RC-HL株)のGタンパク質について様々の抗Gモノクローナル抗体を用いて反応性を調べた。その結果、ワクチンに含まれる狂犬病ウイルスGタンパク質はmAb#1-30-44が認識するエピトープが他の抗体が認識するエピトープよりずっと減少していることが分かった。同様の結果はpH7.4でBPL不活化された狂犬病ウイルスHEP-Flury株を用いた実験からも得られた。しかし、BPL不活化をpH8.0で行った場合は1-30-44エピトープの喪失はかなり抑えられた。このことから、1-30-44エピトープ破壊の一部はBPL処理中のpH低下と関連することが示唆された。次に、ホルマリンで不活性化された狂犬病ウイルスGタンパク質の残存抗原性を調べたところ、やはりpH依存性に抗原性が保持される結果が得られた。

さらに、1-30-44エピトープをもつことがウイルスの免疫原性を発揮するのにも不可欠であることを確認するために動物実験を行った。種々の条件で不活化したウイルスでマウスを免疫した結果、ホルマリンで不活化したウイルスで免疫したマウスから最高の中和抗体価が得られたのに対して、pH7.4でBPL不活性化されたウイルスおよびUV照射ウイルスはホルマリン不活化ウイルスに比べてそれほど高い抗体価が上らなかった。また、pH8.0でBPL不活化したウイルスではpH7.4で不活化したウイルスよりも高い抗体価が得られた。さらに、ホルマリンの最適濃度を見出すために、狂犬病ウイルス粒子をpH8.0で様々な濃度のホルマリンで不活性化し、モノクローナル抗体に対する抗原性をチェックした。その結果、高い濃度(3-10%)のホルマリンではmAb#1-30-44に対する抗原性が大きく減少し、0.1-0.3%ホルマリンで不活化した場合に抗原性の保持が一番よいことがわかった。また、不活化に用いるホルマリンの濃度の免疫原性に及ぼす影響を検討するために動物実験を行った。その結果、0.3%ホルマリンで不活化されたウイルスで免疫したマウスが一番高い中和抗体価を示した。以上から、1-30-44エピトープの保持と免疫原性(中和抗体価の上昇度)とが正の相関性を示すことが強く示唆された。

第3章 mAb#1-30-44を用いた狂犬病ウイルスワクチンの品質管理システムの確立の試み

本章では、狂犬病ウイルスGタンパク質のうち1-30-44エピトープをもつものの比率を調べるための分析的手法の開発を試みた。即ち、抗Gウサギ抗血清および2つの抗Gマウスモノクローナル抗体を使用することにより、狂犬病ウイルスの品質をチェックするための酵素結合免疫測定法(ELISA)を考案した。この方法では、狂犬病ウイルスの抗Gウサギ抗血清でコートしたプレートにウイルス粒子を結合させ、ホルマリンで不活化処理後に、二次抗体として抗Gマウスモノクローナル抗体(#1-30-44又は#1-46-12)を結合させた。次に、抗Gモノクローナル抗体の結合量を比較定量するために三次抗体として、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgY抗体を結合させ、p-ニトロフェニルリン酸を基質として反応させた後、反応産物のp-ニトロフェノールの吸光度を測定した。このELISA法は狂犬病ワクチン中のGタンパク質の保存性のよい他のエピトープと比較して(本実験では1-46-12抗体を用いる)、1-30-44エピトープを保持するものの比率を決定することによりワクチン材料の品質を評価する。この方法によりベータプロピオラクトンで不活化した市販ワクチンを調べたところ、1-30-44エピトープは他のエピトープよりはるかに大きく減っていることが示された。免疫プロット分析によっても、同じ結果が得られた。この結果は第1, 2章の結果と合わせて考察すると、筆者が開発したELISA法は2つの抗Gモノクローナル抗体に対するGタンパク質の反応性の違いをもとにして品質を評価するもので、狂犬病ワクチンの品質管理システムとして有用であることを強く示唆するものである。

以上の結果から、狂犬病ウイルス糖タンパク質がその酸感受性1-30-44エピトープを形成する立体構造を保持することが機能的に重要であるばかりでなく、従来型の狂犬病不活化ワクチンの製造過程において高い免疫原性を示すのに不可欠であることが明らかとなった。そのためにはウイルスの不活化に際して、pHを8.0に保ち、従来使われてきたBPLよりも0.3%ホルマリンで不活化する方がより抗原性の高いワクチンを製造するのに有利であり、コストを下げる効果も期待できることがわかった。

論文審査の結果の要旨

狂犬病ウイルス (RV) の粒子を包むエンベロープ膜には、ウイルスの遺伝子がコードする単一の I 型糖タンパク質 (G) の三量体から成るスパイク突起が多数組込まれている。このタンパク質は合成後、非共有結合三量体を形成して細胞表面に輸送される。G の抗原構造として主要な抗原サイト II と III, マイナーサイト a など数個の孤立したエピトープが報告されている。このほかに、申請者の所属する研究室で作成した抗 G モノクローナル抗体 (mAb) #1-30-44 が認識する立体構造的エピトープは抗原サイト II と III にまたがっていて、202位および336位の離れた2つのアミノ酸を含む領域によって形成され、酸性条件下での構造変換により失われる。G が1-30-44 エピトープを形成するように成熟することは、その本来の機能 (レセプター認識と膜融合) を担う上で不可欠であり、本研究ではこのエピトープに関してさらにいくつかの観点から研究を行った。

狂犬病ウイルス感染細胞では、合成された G の約10%が可溶性の形 (Gs と呼ばれている) で細胞外へ放出され、粒子には組み込まれない。また Gs は動物に対して免疫原性を欠くことが知られている。第1章では、まず12種類の高次構造特異的抗 G mAb を用いて G および Gs の抗原構造を比較したところ、Gs は mAb #1-30-44 によって認識されない点で G と異なっていた。次に、1-30-44 エピトープ形成を指標として C-末端を欠失した2つの G 変異体の cDNA をトランスフェクトした動物細胞における G 分子の成熟状況を調べた。まず、膜貫通 (TM) 領域および細胞質内領域の両方を欠いた G Δ TC 変異体は1-30-44 エピトープを形成せず、細胞の表面にも輸送されず、また細胞外にも放出されなかった。一方、G Δ C 変異体 (これは細胞質側の44アミノ酸のうち C-末端から43アミノ酸を欠く) は、細胞表面へ輸送され、1-30-44 エピトープも形成されたが不安定であった。これらの結果から、1) Gs は細胞表面に輸送された成熟 G タンパク質が切断を受けて放出されること、2) 膜貫通領域が G タンパクの正確な折りたたみおよび輸送に、さらに1-30-44 エピトープをもつ成熟した立構造を維持するのにも不可欠であること、3) 1-30-44 エピトープを欠くことが Gs の免疫原性欠如と関連することが示唆された。

第1章の結論に基づき、第2章では狂犬病ウイルス糖タンパク質 G の1-30-44 エピトープ形成の有無と免疫原性との関係を調べた。まず、 β -プロピオラクトン (BPL) で不活性化した市販の狂犬病ワクチン (RC-HL 株) に含まれる G について抗 G mAb との反応性をみると、1-30-44 エピトープが他のエピトープよりも大きく減少していた。同様の結果は pH7.4 で BPL 不活化した HEP-Flury 株でも得られた。しかし、BPL 不活化を pH8.0 で行った場合は1-30-44 エピトープの喪失がかなり抑えられ、エピトープ破壊の一部は BPL 処理中の pH 低下が原因となることが示唆された。ホルマリン不活性化でもやはり低 pH 依存的に抗原性が失われた。さらに、狂犬病ウイルス粒子を pH8.0 で様々な濃度のホルマリンで不活性化した場合、濃度依存的に1-30-44 エピトープを喪失したが、0.1-0.3%ホルマリンで不活性化した場合には比較的よく保持された。

次に種々の条件で不活化した狂犬病ウイルス粒子の免疫原性をマウスを用いて比較したところ、ホルマリンで不活化した場合に最高の中和抗体価が得られ、ホルマリンの濃度についても、0.3%ホルマリンで不活化したウイルスの方がより高い中和抗体価を示した。これに対して、現行ワクチン製造と同じ条件 (pH7.4 で BPL 処理あるいは UV 照射) で不活性化したウイルス粒子ではそれほど高い抗体価が得られなかった。また、pH7.4 よりも pH8.0 で BPL 不活化したウイルスの方が抗体価がいくぶん高かった。以上から、1-30-44 エピトープの保持と中和抗体価の上昇度でみた免疫原性とは正の相関性を示すことがわかった。

第3章では酵素結合免疫測定法 (ELISA) による狂犬病ウイルスワクチンの品質管理システムの確立を試みた。即ち、2つのマウス抗 G mAb (#1-30-44 および #1-46-12) を用いて、狂犬病ワクチン中の G の保存性のよいエピトープ (本実験では1-46-12 抗体を用いる) と比較して、1-30-44 エピトープを保持するものの比率を決定することによりワクチン製品あるいはワクチン材料の品質を評価する。操作手順は、ウサギ抗 G 抗血清であらかじめコーティングしたプレートにワクチン材料中のウイルス粒子を結合させ、次にマウス抗 G mAb を結合させ、さらにアルカリホスファターゼを結合させたマウス mAb 検出用抗体をつけて、p-ニトロフェニルリン酸を基質とした時の反応産物 p-ニトロフェノールの吸光度を測定する。 β -プロピオラクトンで不活化した市販ワクチンでは1-30-44 エピトープが他のエピトープより大きく

減っていたこと、さらに、0.3%ホルマリンで不活化したウイルス粒子は1-30-44 エピトープの保存が良いことが示され、第2章の免疫プロット分析と同じ結果を得たことから、2つの抗G mAbに対する反応性の違いに基づいて評価する本ELISA法は狂犬病ワクチンの品質管理システムとして有用であることが示された。

以上、申請者は狂犬病ウイルス糖タンパクがその酸感受性1-30-44 エピトープを保持することが機能的に不可欠だけでなく、狂犬病不活化ワクチンが高い免疫原性を発揮する上でも重要であることを明らかにした。特に、pHを8.0に保ち、0.3%ホルマリンで不活化する条件が、抗原性の高い性能の優れたワクチンを製造するのに適しており、コストも大きく下げることから、現在でも低開発国で大量に必要とする狂犬病発症予防用ワクチンの改善にも大きく貢献することが期待される。

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17年2月28日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。