HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the function of ebolavirus glycoprotein-specific antibodies [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	古山, 若呼
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12612号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65647
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Wakako_Furuyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：古山若呼
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the function of ebolavirus glycoprotein-specific antibodies
（エボラウイルス表面糖蛋白質に対する抗体の機能に関する研究）

エボラウイルスは、フィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長動物に重篤な出血熱を引き起こす病原体である。フィロウイルス科には、進化系統学的にエボラウイルス属、マールブルグウイルス属、およびキュエヴァウイルス属に分類される。マールブルグウイルス属およびキュエヴァウイルス属にはそれぞれ1種のみが知られているのに対し、エボラウイルス属は5種(*Zaire ebolavirus*、*Sudan ebolavirus*、*Taï Forest ebolavirus*、*Bundibugyo ebolavirus* および *Reston ebolavirus*)に分けられている。2000年以降、*Zaire ebolavirus*、*Sudan ebolavirus* および *Bundibugyo ebolavirus* によるエボラウイルス病(EVD)がアフリカで頻繁に発生している。これらのウイルスは抗原的に大きく異なっており、属間あるいは種間で交差反応する免疫応答の誘導が困難なため、エボラウイルスに対する予防・治療・診断法の開発にとって問題となっている。2014年の西アフリカでの *Zaire ebolavirus* による EVD 流行の際には、未承認薬ながら抗体療法が実施されたが、使用されたモノクローナル抗体は *Zaire ebolavirus* による EVD に対してのみ有効である。

第1章では、まず、*Zaire ebolavirus* および *Sudan ebolavirus* のウイルス様粒子(VLP)で免疫した BALB/c マウスの脾臓を用いて、5種のエボラウイルス全てを中和する抗体の作出を試みた。フィロウイルスの表面糖蛋白(GP)を纏った非増殖性シュードタイプ水胞性口炎ウイルス(VSV)に対する中和活性を指標に、抗体産生ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングした結果、全てのエボラウイルス種に対して

高い中和活性を示すモノクローナル抗体(6D6)が得られた。次に、6D6 存在下で、*Zaire ebolavirus* の GP 遺伝子をもつ増殖性シュードタイプ VSV を培養することによってエスケープミュータントを選択し、GP のアミノ酸配列を親株と比較したところ、エスケープミュータントの GP には、全てのエボラウイルス種において高度に保存されている Internal fusion loop(IFL)のアミノ酸配列内に変異が見られたことから、この領域がエピトープであると推察された。共焦点顕微鏡を用いて蛍光(DiI)ラベルした VLP の細胞への吸着・取込み・膜融合を抗体存在下および非存在下で比較した結果、6D6 はウイルスの細胞侵入過程における膜融合を阻害することが判明した。さらに、6D6 を治療的に投与したマウスは *Zaire ebolavirus* の致死的感染に対し 100%が生残した。また、*Sudan ebolavirus* を感染させたマウスにおいても、6D6 の投与による治療効果が認められた。これらの結果によって 6D6 の投与が複数のエボラウイルスに対して効果的であることが判明した。

一方で、エボラウイルスの GP に対して誘導される抗体の一部は、*in vitro* でウイルスの感染を増強することが知られている(抗体依存性感染増強現象 : ADE)。エボラウイルス感染におけるこの現象は、GP に対する抗体が Fcγ 受容体 IIa(FcγRIIa) あるいは C1q と C1q 受容体を介して細胞とウイルスとを架橋することによって引き起こされると考えられているが、ADE の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。第 2 章では、FcγRIIa を介する ADE に着目し、FcγRIIa 下流のシグナルと ADE との関連について検討した。まず、エボラウイルス非感受性細胞(Jurkat 細胞)を用いて、FcγRIIa またはその細胞内領域を欠失させた変異体(FcγRIIaΔCT)を強制発現させた細胞を作出し、ADE による感染効率を比較した。その結果、FcγRIIa の細胞内領域が ADE に重要であることが判明した。次に、FcγRIIa を恒常的に発現している K562 細胞を用いて、FcγRIIa 下流の各種シグナル阻害剤の効果を調べ ADE に必要なシグナルの特定を試みたところ、Src family PTK 特異的阻害剤である PP2 が、細胞内の Src family PTK のリン酸化を阻害することによって ADE を介した感染のみを顕著に阻害することが判明した。最後に、共焦点顕微鏡を用いて DiI ラベルした *Zaire ebolavirus* の VLP の細胞への吸着・取込みを抗体存在下および非存在下で比較した結果、ADE 抗体存在下で、VLP の細胞への吸着数に変化は見られなかったが、細

胞内への取り込み効率は上昇していた。さらに、その上昇は PP2 によって阻害された。また、細胞内に取り込まれた VLP はマクロピノサイトーシス/ファゴサイトーシスマーカーとエンドソームに共局在していた。これらの結果によって、ADE 抗体は FcγRIIa 下流の Src family PTKs を介したシグナル伝達経路を活性化し、マクロピノサイトーシス/ファゴサイトーシスを誘導することによって細胞へのウイルスの取り込み効率を上昇させ、その結果、感染増強が引き起こされていることが明らかとなった。

本研究では、既知の全てのエボラウイルス種に対して交差中和活性をしめすモノクローナル抗体を世界に先駆けて作出した。さらに、そのエピトープを解析するとともに中和メカニズムを明らかにし、汎用性の高い EVD 治療用抗体医薬の開発に繋がる重要な知見を提供した。また、ワクチンや抗体医薬開発にとって問題となる ADE のメカニズムを解析し、Src family PTKs を介したシグナル伝達経路が重要であることを見出した。これらの知見は、今後 EVD の予防・治療法開発に大きく貢献することが期待される。