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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：古山　若呼

審査委員	主査　教授	高　田　礼　人
	副査　教授	澤　　洋　文
	副査　教授	東　　秀　明
	副査　准教授	好　井　健太朗

学位論文題名

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。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ワクチンおよび抗体療法の開発にとって問題となっている。2013-2016年に西アフリカで *Zaire ebolavirus* によるエボラウイルス病(EVD)が流行した際に、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* に対してのみ有効である。2000年以降、*Zaire ebolavirus* だけでなく、*Sudan ebolavirus* および *Bundibugyo ebolavirus* による EVD もアフリカで頻繁に発生しているため、*Zaire ebolavirus* 以外のウイルスによる EVD に対する抗体療法の開発が急務となっている。

第1章では、5種のエボラウイルス全てを中和するモノクローナル抗体の作出を試みた。フィロウイルスの表面糖蛋白質(GP)を纏った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 領域内にアミノ酸置換が認められたことから、この領域がエピトープであると推定された。共焦点顕微鏡を用いて、蛍光(DiI)ラベルしたウイルス様粒子(VLP)の細胞への吸着・エンドゾームへの取込

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過程を阻害することが判明した。さらに、*Zaire ebolavirus* および *Sudan ebolavirus* に対する 6D6 の治療効果を動物モデルで実証した。

第 2 章では、中和活性と相反する抗体の機能について解析した。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)。そのメカニズムの一つは、GP に対する抗体が Fcγ 受容体 IIa(FcγRIIa)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ものである。本研究では、ADE の詳細なメカニズム解明のために、FcγRIIa 下流のシグナルと ADE との関連について解析した。まず、エボラウイルス非感受性細胞に 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、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 下流の各種シグナル阻害剤を用いて 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 を阻害することが分かった。さらに、Src family PTK をノックダウンした細胞でも ADE の阻害が認められた。最後に、共焦点顕微鏡を用いて DiI ラベルした 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 抗体存在下では VLP の細胞内への取り込み効率が上昇する事が明らかとなった。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内に共局在した。これらの結果によって、FcγRIIa を介したエボラウイルスの ADE は、Src family PTK シグナル伝達によって誘導されるマクロピノサイトーシス/ファゴサイトーシスの活性化によって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有する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 PTK 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。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者古山若呼氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。