



Title	Inhibiting Canine Distemper Virus infection by generating monoclonal antibodies targeting Hemagglutinin Protein [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	MWABA, MWILA HILTON
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13773号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75926
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MWABA_MWILA_HILTON_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 Mwila Hilton Mwaba

審査担当者	主査	教 授	前 仲 勝 実
	副査	教 授	小 川 美香子
	副査	准教授	黒 木 喜美子
	副査	講 師	高 倉 栄 男
	副査	特任助教	福 原 秀 雄

学 位 論 文 題 名

Inhibiting Canine Distemper Virus infection by generating monoclonal antibodies targeting Hemagglutinin Protein

(ヘマグルチニンタンパク質を標的としたモノクローナル抗体による犬ジステンパーウイルスの感染阻害)

博士学位論文審査等の結果について(報告)

近年、犬ジステンパーウイルス(CDV)の宿主域が拡大してきている。特にサルへの感染に関する報告では、CDVがヒトに感染するよう進化することが懸念されている。CDVは、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属しており、この属には牛痘ウイルスや麻疹ウイルス(MeV)も含まれる。MeVは牛痘ウイルスから進化し、ヒトに感染するようになったと考えられており、これはCDVにも種の壁を越える能力がある可能性を示唆している。これらの宿主特異性を決める分子は、ウイルス表面に存在するヘマグルチニン(H)タンパク質であり、宿主の受容体に結合することによりウイルス感染を成立させる。他方、Hタンパク質は、中和抗体の主要な標的であり、その中和抗体は、(1)Hタンパク質と受容体との相互作用(2)Hタンパク質と融合タンパク質(F)との相互作用(3)Fタンパク質の構造変化の阻害、のいずれかを作用点としている。CDVやMeVの感染防御において、それらに対するワクチンは大変有効であるが、終生免疫が効率よく獲得される機構は不明であった。これに対し、著者の所属する研究室ではMeVのHタンパク質の立体構造解析を行い、MeV由来Hタンパク質の表面は多くが糖鎖で覆われており、受容体に結合する部位のみ露出していることから、その部位に効率よく中和抗体が産生される機構を提唱している。そこで、本論文は、サルから分離されたウイルス株CYN07-dVのHタンパク質をラットに免疫することでモノクローナル抗体を作成し、そのウイルス感染阻害効果やエピトープ同定等を評価した。これにより、Hタンパク質を標的とする中和抗体産生能とそのメカニズムを検証し、さらに将来の宿主域拡大に備えてCDVやMeVへ交差反応性を有するモノクローナル抗体の開発を目指した。

著者はまず、CDVのCYN07-dV株に由来するHタンパク質のヘッドドメイン(CDV-H)をHEK293T細胞で発現させた。CDV-Hは培養上清からNiアフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、生理的条件下で二量体であることを確認した。この精製したCDV-Hを8週齢の雌Wistarラットに免疫し、2週間後に腸骨リンパ節から分離したリンパ球とX63-Ag8.653ミエローマ細胞を融合させてハイブリドーマを作成した。ELISA法を用いたスクリーニングにより、CDV-Hタンパク質に結合を示す6つのモノクローナル抗体(mAb)を得た。

続いて、これらmAbの中和活性を融合阻害アッセイで評価した。融合アッセイは、Hタンパク質が認識する犬SLAM受容体を恒常的に発現したVero細胞に、CDVのHタンパク質と融合タンパク質、EGFPをコードした発現プラスミドをトランスフェクションし、mAb存在下で細胞融合の程度を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、すべてのmAbがSLAM受容体とCDV-Hとの相互作用を阻害

することが示された。さらに6つのCDV株（京都ワクチン、5VD、A75/17、CYN07-dV、MSA5、Ac96I）やMeV株（IC-B、Edmonston）のHタンパク質についてもヘッドドメインを調製し、ELISAによって反応性を評価したところ、一部のmAbは交差反応することが示された。これらの結果は、6つのCDVと2つのMeVのHタンパク質で、受容体結合部位およびその近くに保存されているアミノ酸残基がmAbと相互作用するエпитープであることを強く示唆するものであった。よって、CDV-HもMeV-Hと同様に受容体結合部位を少なくとも主要な標的として抗体が産生されることがわかった。さらに、CDV-HおよびMeV-Hの両方に結合する抗体の作成にも成功したことから、広くモルビリウイルス属に作用し得るワクチンおよび抗体の調製が可能であることが示唆された。

このように、著者は、CDV感染を阻害し得る抗CDV-Hモノクローナル抗体を開発し、その性能評価を行ったものであり、CDV感染の脅威に際し、その感染および中和抗体産生機構の解明に大きく貢献するものである。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。