

学 位 論 文 題 名

Specificity and function of filovirus glycoprotein-specific antibodies

(フィロウイルス表面糖蛋白質に対する抗体の特異性および機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

フィロウイルスは進化系統学的にエボラウイルス5種およびマールブルグウイルス1種に分類され、いずれも霊長類に重篤な出血熱を引き起こす。フィロウイルスの自然宿主および感染経路は不明で、効果的なワクチンや治療法も未だ確立されていない。これまでに開発された抗体検出ELISA法では主に核蛋白質 (NP) が抗原として使用されているが、NPに対する抗体はウイルス種間で交叉反応性が高く、各ウイルス種に対する特異抗体を区別することが困難である。第一章では、ウイルス種によって抗原性の異なる表面糖蛋白質 (GP) を抗原に用い、感染ウイルス種の特定が可能な抗体検出ELISA法を確立することを目的とした。

GPの膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させ、ヒスチジンタグを付加した分泌型組換えGPを発現するプラスミドを構築し、これを導入した培養細胞の上清からニッケルビーズカラムで組換えGPを精製した。精製した組換えGPをELISA抗原とし、マウスの免疫血清、実験感染サル血清、患者血清中の特異抗体の検出を試みたところ、各ウイルス種に対するIgG抗体を種特異的に検出可能であった。また、これまでのELISA法では検出困難だったIgM抗体が急性期患者血清から種特異的に検出可能であった。フィロウイルス感染初期にはGPが血液中に大量に放出されることから、ウイルス粒子内部に存在するNPに比べ、GPはB細胞に容易に認識されうるため、患者血清中のIgM抗体を検出可能であったと考えられた。

第二章では、フィロウイルスのGPに対する抗体の機能と病原性に関する研究を行った。エボラウイルスのGPに対する抗体の中には、中和抗体だけでなく、ウイルスの感染性を増強させる抗体が存在することが分かっている。本研究では、マールブルグウイルスにおけるこの抗体依存性感染増強現象 (ADE) と病原性との関係を解明することを目的とした。

病原性の異なるマールブルグウイルス、Angola株とMusoke株のGPに対する免疫血清およびモノクローナル抗体を作出し、水胞性口炎ウイルスの表面糖蛋白質をAngola株およびMusoke株のGPに置換したシュードタイプウイルスを用いた中和試験および感染増強試験を実施した。Angola株およびMusoke株の

間で、免疫血清の中和活性および中和抗体クローンの誘導能には差はみられなかったが、マールブルグウイルスの中で最も病原性が高いと考えられているAngola株に対する免疫血清およびモノクローナル抗体でADE活性は顕著に認められた。これらの結果から、マールブルグウイルスの病原性発現にADEが関与する可能性が示唆された。さらに、Angola株とMusoke株GPのキメラ体、欠失変異体および点変異体を作成し、ADEに関与するGP分子上の領域を探索した。その結果、ADE抗体のエピトープはAngola株GP上の糖鎖に富むムチン様領域内に多く存在することおよびAngola株とMusoke株のADE活性の違いは、膜融合を担うGP2領域内の547番目のアミノ酸の違いによって決定されることが明らかとなった。マールブルグウイルスが宿主因子のC型レクチンを介して細胞へ吸着した場合、エンドサイトーシスによる細胞への侵入または膜融合のステップで、547番目のアミノ酸が重要であることが示されており、ADEを介した感染時にも、このアミノ酸が重要な役割を担っていると考えられた。

本研究で開発したELISA法は各フィロウイルス種に対する抗体を特異的に検出可能であったことから、確定診断のための有用な情報を提供すると考えられる。また、本法はフィロウイルス感染症の血清疫学調査を行う際の有効な手法となる。さらに、本研究でGPに対する抗体の一部がマールブルグウイルスの感染を増強する現象を見出し、ワクチン開発のための重要な知見を提供した。これらの成果は、フィロウイルスの生態解明および本ウイルス感染症の予防・治療法の開発に大きく貢献すると期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高田	礼人
副査	教授	鈴木	定彦
副査	教授	澤	洋文
副査	准教授	荻	和宏明

学位論文題名

Specificity and function of filovirus glycoprotein-specific antibodies

(フィロウイルス表面糖蛋白質に対する抗体の特異性および機能に関する研究)

フィロウイルスは進化系統学的にエボラウイルス（5種）およびマールブルグウイルス（1種）に分けられる。これまでに開発された抗体検出法では、主に核蛋白質(NP)が抗原として使用されているが、NPに対する抗体はウイルス種間で交叉反応性が高く、各ウイルス種に対する特異抗体を区別できない。第一章では、フィロウイルスの唯一の表面蛋白質で、ウイルス種によってアミノ酸配列の同一性の低い表面糖蛋白質(GP)を用い、感染ウイルス種の特定が可能な抗体検出ELISA法を確立した。

GPの膜貫通領域と細胞質内領域を欠失させ、ヒスチジンタグを付加した分泌型組換えGPを発現するプラスミドを構築し、これを導入した培養細胞の上清からニッケルビーズカラムで組換えGPを精製した。精製した組換えGPを抗原とし、マウス免疫血清、実験感染サル血清、患者血清中の特異抗体を検出したところ、ウイルス種特異的IgG抗体が高感度で検出可能であった。また、IgM抗体も急性期患者血清から種特異的に検出可能であった。本研究で開発したELISA法は、フィロウイルス感染症の診断および疫学調査に活用できると考えられる。

第2章では、GPに対する抗体の機能と病原性に関する研究を行った。エボラウイルスのGPに対する抗体の中には、中和抗体だけでなく、ウイルスの感染性を増強する抗体が存在することが分かっている。本研究では、マールブルグウイルスにおけるこの抗体依存性感染増強現象(ADE)と病原性との関連を解析した。病原性の異なるマールブルグウイルス、Angola株およびMusoke株のGPに対するマウス免疫血清およびモノクローナル抗体を作出し、水胞性口炎ウイルスの表面糖蛋白質をマールブルグウイルスのAngola株およびMusoke株のGPに置換したシュードタイプウイルスを用いた中和試験およびADE試験を行った。Angola株およびMusoke株の間で、免疫血清の中和活性および中和抗体クローンの誘導能には差はみられなかったが、ADE活性は、Angola株GPに対する抗体にのみ顕著に認められた。この結果から、ADE抗体誘導能はAngola株およびMusoke株の病原性の違いと相関しており、マールブルグウイルスの病原性発現にADEが関与している可能性

が示唆された。

本研究では、フィロウイルス粒子がもつ唯一の表面蛋白質であるGPに対する抗体の特異性に着目し、感染したウイルス種を特定する抗体検出法を確立した。さらに、これらのGPに対する抗体の一部がマールブルグウイルスの感染を増強する現象を見出し、病原性発現への関与を示唆した。これらの成果は、フィロウイルスの生態解明および予防・治療法開発におおいに貢献すると考えられる。よって審査委員一同は、上記論文提出者、中山絵里氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。