

学位論文の要旨	
氏名	楊九駢
学位論文題目	ファージディスプレイ法を用いた高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに特異的なヒト抗体の確立と性状解析
<p>本論文は、H5-Fc を標的とした抗体分子の開発およびその機能解析を行い、それについてまとめたものである。本論文は以下の6章から成り立っている。</p> <p>第1章では、H5 HA とウイルス感染疾患との関連性を示し、H5-Fc をターゲットとした治療開発の戦略について述べた。H5 (Hemagglutinin of H5N1 virus) は、目標となる動物細胞の感染に対して重要な役割を演じている膜タンパク質である。現在まで高病原性のH5N1ウイルスはまだヒトからヒトへ感染をしていないが、26ヶ国まで広がっており、400人以上の死者も出ている、最も恐ろしいのは致死率が60%も超えているということが世界保健機関により報告され、このような現状から未だ、有効な治療薬が開発されていないので早急な開発が現在求められている。</p> <p>第2章では、ヒトscFv 抗体ファージライブラリーについて述べた。1980年にKoller と Milstein によって動物免疫を基盤としたハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体作製法が確立されてから4半世紀を経て、抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来モノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性の解決に向けた近年の目覚ましい技術革新がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子群をマウスに移入したトランスクロモマウスおよびヒト抗体ファージディスプレイライブラリーが報告されている。本研究</p>	

では、20名の健常人由来の末梢血単核球をもとに構築されたヒトscFv抗体ファージライブラリーを用いている。

第3章では、ヒトscFv抗体ファージライブラリーから、H5に依存した感染症疾患の治療に応用できるヒト抗体の単離を試みた。そのため、H5-Fcに特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。H5-Fcタンパクをターゲットとして抗体ファージライブラリーから選別を行い、27種類のH5-Fc特異的ヒト抗体分子を単離した。さらに、これらの抗体の中に3D1抗体の性状について解析した。単離した3D1抗体は、感染性インフルエンザウイルスを特異的に認識することが分かった。3D1抗体がH5-Fcによる細胞との結合を阻害するかどうかを検討した。3D1抗体が細胞株MDCKとの結合を濃度依存的に阻害することがわかった。

第4章では、3D1抗体がH5-Fcによる細胞の結合を阻害できることがわかったので、3D1抗体が感染性インフルエンザウイルスの感染を中和するかどうかを調べた。その結果3D1抗体がインフルエンザウイルスの感染に中和することがわかった。以上の結果より、H5に特異的に結合する抗体分子の単離に成功したが、インフルエンザウイルスの感染に中和力価が非常に低かった。今後は、抗体エンジニアリングによりこの抗体を応用していく。

第5章では、3D1抗体がH5-Fcによる細胞の結合を阻害できることから、3D1がH5のレセプターバインディングサイトを認識すると考えられたため、3D1は本研究で作製されたH5のシュガーバインディングドメインの構造を認識しており、この抗体を用いてペプチドファージライブラリーから特異的結合活性を有するペプチドファージクローンを単離した。この抗体はH5-Fcの結合を阻害するので、抗体が認識するエピトープは細胞の結合に重要な残基を認識していると考えられる。

3D1抗体を用いてパンニングを行ったところこの抗体に特異的なペプチドファージクローンの単離に成功した。3D1抗体より得られたペプチド配列を解析したところ2種類の3D1に特異的に結合し、3D1-1ペプチド配列(5/6)は2つの部分に分けられ、H5の1次配列との2箇所において低い相同性を示したことからこの抗体はH5の高次構造を認識しているという

ことを示唆している。

第6章は、以上の結果を総括し、高病原性鳥インフルエンザ感染の予防、治療法の開発における展望及び残された課題について述べた。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第345号	氏名	楊九駢
審査委員	主査	杉村和久	
	副査	隅田泰生	伊東祐二
<p>学位論文題目            ファージディスプレイ法を用いた高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに特異的なヒト抗体の確立と性状解析 (Establishment and Characterization of Human Single-Chain Antibodies Against Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses using phage-display technology)</p> <p>審査要旨            提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1の感染に対する重要な役割を果たしている分子を標的とし、ファージディスプレイライブラリーを用いてH5のHAに特異的に認識する抗体の単離と、それにより単離されたscFv抗体の機能解析を行ったもので、全文6章より構成されている。</p> <p>第1章は高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1型)について述べた序論である。本研究では20名の健常人由来の末梢血単核球をもとに構築されたヒト一本鎖(scFv)抗体ファージライブラリーを用いており、第2章では、その一般論についてまとめている。第3章では、ヒトscFv抗体ファージライブラリーから、鳥インフルエンザウイルスのヘムアググチニン分子H5を標的としたヒト抗体の単離を試みた。そのため、H5にヒト抗体のFc領域を融合させたH5-Fc分子を用い、H5に特異的に結合するヒト抗体のスクリーニングを行った。27種類のH5-Fc特異的ヒト抗体分子を単離し、さらに、これらの抗体の中の3D1抗体は、感染性インフルエンザウイルスを特異的に認識し、H5-Fcによる細胞との結合を抗体の濃度依存的に阻害することを明らかにした。第4章では、単離した抗体が感染性高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1感染の中和する活性を有することを明らかにした。第5章では、3D1抗体がH5-Fcと細胞との結合を阻害できることから、3D1がH5のレセプター結合部位を認識すると考えられたため、当研究室で行ったバキュロウイルス発現システムにより、H5の糖鎖結合ドメイン(SBD)のリコンビナント分子を作製し、SBDの活性及び3D1との結合特異性の解析結果を示している。その結果、作製したSBDが、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞株、MDCK細胞に濃度依存的に結合することを示し、細胞表面のシアル酸に結合活性を持つことを示唆している。また、この発現したSBDが、3D1抗体へ濃度依存的に結合することから、3D1抗体がH5の根本ドメイン領域に認識してHAとhost細胞のエンドソームの膜融合を阻止して、インフルエンザウイルスの感染を中和のではなく、SAとHAの結合を阻害することにより、インフルエンザウイルスの感染を中和することを示唆しており、第3章で示された阻害実験結果と一致していることを示した。さらに3D1抗体より得られたペプチド配列を解析した結果は3D1抗体のエピトープがH5アミノ酸の190-helix #204-#211と130-loopの#128-#131の領域に低い相同性を認め、この結果はインフルエンザウイルス表面のHAが細胞表面のSAに認識するとき重要な役割を果たしていることが報告されている一つのhelix(190-helix)と二つのloop(130-loop, 220-loop)の構造に一致していることを示した。第6章は、高病原性鳥インフルエンザ感染の治療、予防とインフルエンザワクチン開発における総括と展望である。</p> <p>以上、本論文は、ファージディスプレイ法により単離したH5に特異的な中和抗体の確立し、その結合部位の同定まで達成したことを報告している。この成果は、H5のSBDの特定のアミノ酸残基を変異させる実験を行うことにより、シアル酸との結合特異性に寄与している重要なアミノ酸を予測する可能性を示唆している。3D1抗体の結合特異性の情報は国際的にも初めての成果として高病原性インフルエンザワクチン開発にも有用であり、今後の研究の発展が期待される。</p> <p>以上のことより、審査委員会は博士(工学)の学位論文として合格と判定した。</p>			

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第345号	氏名	楊九 駢
審査委員	主査	杉村和久	
	副査	隅田泰生	伊東祐二
<p>本学位論文の本審査は、平成23年2月9日、午前11時より、鹿児島大学工学部共通棟303号室にて、主査、杉村和久教授、副査、隅田泰生教授、伊東祐二教授の出席のもと、その他聴講者が25名程度の前で行われた。約35分の博士論文発表の後、25分間程度、以下の諮問を含む質疑応答が行われた。代表的な質疑/応答を要約する。</p> <p>質問1) イムノクロマトグラフィーなどの検査試薬への応用について：        回答：本研究で用いられたHAはA/VentNam/1194/2004株由来で、作製した3D1抗体はH5N1への特異性が高いので、この株に対する検査試薬として使えると考えられる。しかしながら、インフルエンザウイルスのHAが中和抗体の認識から逃げられるように変異しているため、異なるクレードの同じsubtypeの高病原性H5N1ウイルスや異なるsubtypeのウイルスには検査試薬への応用には不向きであるという考えが述べられた。</p> <p>質問2) インフルエンザ感染治療への応用について        回答：高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1はいずれかの時点で、パンデミックを起こすことが懸念されている。トリインフルエンザH5N1ウイルスA/VentNam/1194/2004の株が効率的にヒトへの感染する場合、単離した抗体がヒト由来なので臨床実験や治療実験が必要となるが感染治療への応用が可能であることが述べられた。</p> <p>質問3) 3D1抗体の特異性に関して、季節インフルエンザウイルスの中和活性と結合活性について        回答：3D1抗体は高病原性インフルエンザウイルスH5N1に対する特異的に反応し、低い中和活性を持つことが示されたが、季節インフルエンザウイルスに対しては反応性を示さなかったことが述べられた。また、3D1はH5のSBDを認識しているが、異なるサブタイプのHAのSBDに対する交差反応について        SBDの構造はアミノ酸配列に変異が入ってもその構造は保たれている可能性があり、H5のSBDを認識している3D1抗体が異なるサブタイプのウイルスにも交差反応する可能性が考えられるが、今回の実験結果では、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1とは異なる季節インフルエンザウイルスH1N1には反応性を示さなかったことが述べられた。</p> <p>質問4) エピトープ解析で得られたペプチドモチーフHAの配列で、ホモロジーを示した2つの領域がエピトープであると結論付けてよいかについて        回答：今回の結果だけで、エピトープであると結論付けることはできないが、結合活性のあるH5N1 (VN04) のHAのアミノ酸配列と、結合活性を示さなかったH1N1 (NC99) のHAの配列を比較すると、3D1のエピトープと考えられる二つの領域のアミノ酸配列は大きく異なるので、今回同定したHAの二つの領域は3D1のエピトープである可能性を示唆している。直接的に証明するためにはエピトープ領域のアミノ酸変異を入れたHAタンパクとの結合活性を解析、もしくは、3D1とHAの共結晶を用いた立体構造解析を行う必要があることが述べられた。</p> <p>質問5) 3D1のエピトープは二つの領域にあることを示したが、抗体の結合様式はどのようになるかについて        回答：単離された27種類のscFv抗体のV-遺伝子の解析を行うとH鎖は共通のV-遺伝子由来の配列であり、H鎖が結合の中心的な役割を担っていると考えられ、3D1抗体がH5の2つの領域に結合する様式としては、H鎖とL鎖のそれぞれが単独で、それぞれの領域と結合している可能性が述べられた。HAはtrimerとして存在するので、trimerの立体構造モデルで考えると2つの領域は近接するため、1つの抗体分子で同時にこれらの領域を認識している可能性も考えられる。</p> <p>以上のように、申請者は、上記の諮問ならびに質疑に的確に回答し、博士(工学)の学位を授与するに値する学力を有していると判断された。</p>			