

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390076

研究課題名（和文）免疫低下霊長類モデルを用いた新型インフルエンザに対する新規抗体治療法の開発

研究課題名（英文）Antibody therapy against novel influenza virus infection using an immunosuppressed non-human primate model

研究代表者

伊藤 靖 (ITO H. YASUSHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

研究成果の概要（和文）：この研究の目的は免疫力が低下した状態でも有効な抗インフルエンザ薬の開発である。そのためにインフルエンザウイルスのヘムアグルチニンに結合し、ウイルスを中和可能なヒト型抗体を開発した。免疫抑制剤を投与したカニクイザルに高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させると重症化するが、今回開発した抗体をウイルス感染後に投与すると生存率を向上させることができた。霊長類で有効性が確認されたので、免疫の低下した人でも今回開発した抗体の治療効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is development of anti-influenza virus drugs that are effective under the immunocompromised condition. We developed human-mouse chimeric anti-influenza virus hemagglutinin antibody with neutralizing activity. Administration of the antibody to immunosuppressed cynomolgus macaques improved survival rates in highly pathogenic avian influenza virus infection, whereas immunosuppressed macaques without the treatment showed severe symptoms. It is expected that the therapy with the developed anti-hemagglutinin antibody would be effective in immunocompromised influenza patients as confirmed in the immunosuppressed macaque model.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総 計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：インフルエンザウイルス、霊長類モデル、抗体医薬、免疫抑制、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

2009年にパンデミックインフルエンザが登場し、全世界で流行した。また、H5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの人での感染が依然として発生しており、季節性インフルエンザのみならず、異なる亜型のインフルエンザAウイルスに対する対策が必要であった。さらに、パンデミック後は季節性インフルエンザへと移行することから季

節性インフルエンザ感染が重症化しやすい免疫低下者に対策の重点を移す必要がある。

現行のインフルエンザ感染対策にはワクチンと抗ウイルス薬がある。ワクチンは宿主の獲得免疫反応を活性化し、また抗ウイルス薬はウイルスの細胞からの出芽を阻害し、獲得免疫反応が働くまでウイルスの拡散を抑制する。すなわちいずれも宿主

の獲得免疫反応が必要である。従って、免疫が低下している患者ではこれらの対策のみでは不十分と考えられた。そこで免疫低下患者に使用可能な新規予防法、治療法の開発が必要であり、本計画が立案された。

## 2. 研究の目的

(1) インフルエンザウイルス抗原と反応するモノクローナル抗体、特に複数の亜型と反応する抗体を作成する。これらの抗体を人に投与可能なヒト化抗体に改変する。

(2) 免疫低下状態のインフルエンザウイルス感染者の病態を反映する霊長類モデルを確立し、インフルエンザウイルスの霊長類における病原性を免疫不全ではない状態と比較する。

(3) 免疫低下霊長類モデルを用いて、インフルエンザ感染症に対して抗体療法の有効性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗ヘムアグルチニン抗体の作成

全粒子不活化ワクチン及びヘムアグルチニンの一部の配列とマウス主要組織適合抗原複合体クラス II 分子に結合する配列を組み合わせたハイブリッドペプチドを抗原として用いた。抗原をアジュバントと混合しマウスを数回免疫後、脾臓及びリンパ節細胞とBリンパ球腫瘍を融合させてハイブリドーマを作成した。ウイルス抗原を用いて、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にてスクリーニングし、ヘムアグルチニンと反応するモノクローナル抗体を得た。このうち H5 亜型ヘムアグルチニンと反応する抗体産生細胞から免疫グロブリン遺伝子を回収し、定常部を人の IgG 定常部と入れ替えキメラ抗体を作成した。

### (2) カニクイザルの免疫抑制

カニクイザルにシクロフォスファミドとシクロスポリン A を投与し、免疫抑制状態を誘導した。

### (3) カニクイザルのインフルエンザウイルス感染実験

2009 年の H1N1 亜型パンデミックウイルス及び 2004 年にベトナムの死亡患者より分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスをカニクイザルに感染させた。テレメトリー送信器を用いて、体温を測定した。気管支内視鏡等を用いて、気道拭い液を採取し、ウイルスを定量した。感染実験はバイオセーフティレベル 3 実験室で行われた。

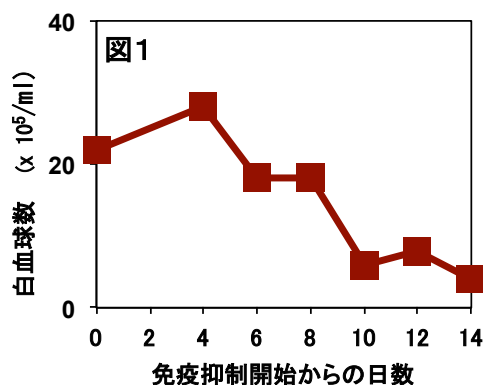
## 4. 研究成果

### (1) インフルエンザウイルス特異的モノクローナル抗体の作成

作成したモノクローナル抗体のうち 1 個は H5 亜型ヘムアグルチニンの受容体結合部周囲に結合した。この抗体からヒトマウスキメラ抗体を作成した。また、データベースのアミノ酸配列からヘムアグルチニン亜型間での差異の少ない HA2 部分の配列を選択した。この配列とマウス主要組織適合抗原複合体クラス II 結合性配列と組み合わせたハイブリッドペプチドで免疫して得られたモノクローナル抗体は H1、H3、H5、H7、H9 のウイルス抗原と反応した。

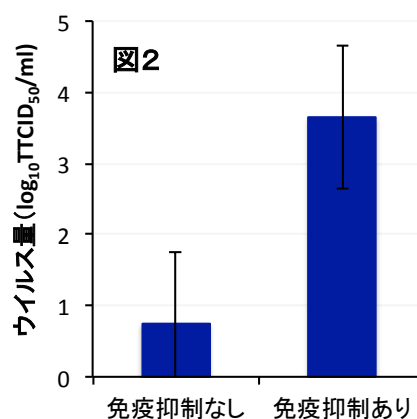
### (2) 免疫低下霊長類モデルの確立

カニクイザルにシクロフォスファミドとシクロスポリン A を投与すると、投与開始 6 日後から末梢血白血球が減少し、投与開始から 14 日後まで減少は持続した (図 1)。これらの白血球を *in vitro* で刺激するとインターロイキン-2 (IL-2) の産生が低下していることが判明した。

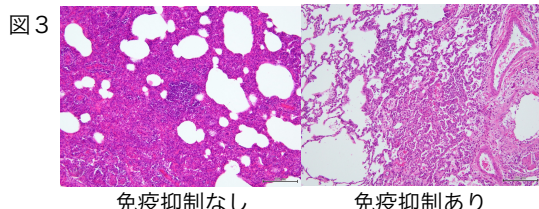


この状態のカニクイザルにパンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザウイルス、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させ、病原性を解析した。

パンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザウイルスを感染させると感染 7 日後に免疫抑制したサルの上気道では免疫抑制がないサルより高いウイルス価が見られた (図 2)。



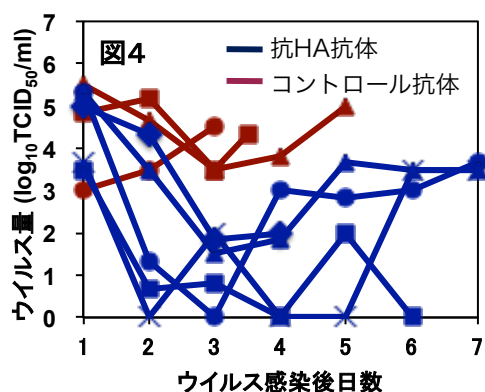
一方、肺では免疫抑制のため、少数の炎症細胞の浸潤しかみられず、免疫抑制がない場合と比較し組織学的には肺炎は軽度であった（図3）。しかし、肺組織中のサイトカインを測定したところ IL-18、IL-6 などのサイトカインは上昇しており、免疫抑制状態でもサイトカイン反応は起こることが判明した。



死亡患者から分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた免疫抑制サルは感染 7 日以内に重症化し、肺と血液中でサイトカインの上昇が見られた。

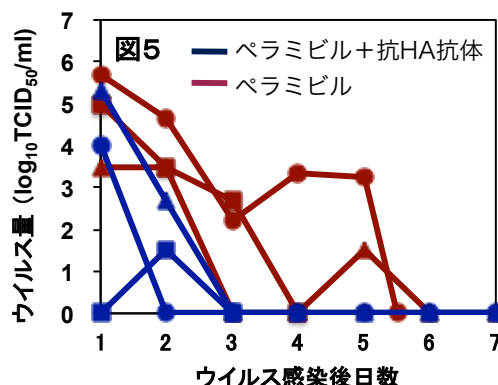
### （3）免疫低下状態での抗ヘムアグルチニン抗体の効果

免疫抑制状態のサルに H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させ、感染翌日と 3 日後キメラ抗ヘムアグルチニン抗体を静脈に投与した。抗体を投与したサルでは気道のウイルス量が低下した（図4）。また、抗体を投与しないサルは感染 5 日後までに全頭死亡したのに対し、抗体を投与したサルは生存率 60%であった。従って、抗ヘムアグルチニン抗体療法は免疫低下状態の個体の生存率向上に効果があることが判明した。



この実験では抗体投与終了後、ウイルス量の上昇が見られた。このウイルスは抗体に低反応性の耐性ウイルスの可能性が疑われた。そこで耐性ウイルスの出現の確率を低減させるため、抗ヘムアグルチニン抗体とノイラミニダーゼ阻害剤ペラミビルとの併用効果を解析した。免疫抑制状態のサルに H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させ、感染 1 日と 3 日後に抗ヘムアグルチニン抗体、感染 1 日から 5 日後までペラミビルを投与した。抗ヘムアグルチニン抗体とペ

ラミビルを併用したサルでは感染 7 日後にはウイルスは検出されず、より効率が良くウイルス複製を抑制したことが示された（図5）。



現在、耐性ウイルスの出現を調べるため、抗ヘムアグルチニン抗体投与後に検出されたウイルスのヘムアグルチニンの塩基配列とアミノ酸配列を解析中である。また、複数の亜型ヘムアグルチニンと反応する他のモノクローナル抗体のウイルス複製阻害能の解析を継続中である。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Kitano M, Kodama M, Ito Y, Kanazu T, Kobayashi M, Yoshida R, Sato A. Efficacy of repeated intravenous injection of peramivir against influenza A (H1N1) 2009 virus infection in immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol. 57, pp. 2286-2294, 2013査読有 (doi:10.1128/AAC.02324-12)
- ② Arikata M, Ito Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys

carrying Mafa-A1\*052:02. *PLoS ONE* Vol. 7, pp. e37220, 2012 査読有 (doi: 10.1371/journal.pone.0037220)

- ③ Kitano M, Itoh Y, Kodama M, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Baba K, Noda T, Sato K, Nishashi Y, Kanazu T, Yoshida R, Torii R, Sato A, Ogasawara K. Efficacy of single intravenous injection of peramivir against influenza B virus infection in ferrets and cynomolgus macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol. 55, pp. 4961-4970, 2011 査読有 (doi:10.1128/AAC.00412-11)
- ④ Kitano M, Itoh Y, Kodama M, Ishigaki H, Nakayama M, Nagata T, Ishida H, Tsuchiya H, Torii R, Baba K, Yoshida R, Sato A, Ogasawara K. Establishment of a cynomolgus macaque model of influenza B virus infection. *Virology* Vol. 407, pp. 178-184, 2010 査読有 (doi:10.1016/j.virol.2010.08.006)

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 伊藤靖、Pham Van Loi、仲山美沙子、七戸新太郎、石垣宏仁、有方雅彦、石田英晃、北川直子、岡松正敏、迫田義博、喜田宏、笠原一誠、免疫抑制カニクイザルを用いたパンデミック H1N1 亜型インフルエンザウイルスの病原性の解析、第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、平成 25 年 6 月 28 日-30 日、北海道大学 (北海道)
- ② Itoh Y, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Ogasawara K. Therapeutic efficacy of a human-mouse chimeric anti-H5 hemagglutinin antibody on lethal H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 7 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

③ Itoh Y, Arikata M, Okamatsu M, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Kida H, Ogasawara K. An inactivated whole particle vaccine induced memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1\*052:02. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 2012 年 11 月 18 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

④ Itoh Y, Arikata M, Ishigaki H, Nakayama M, Ishida H, Ogasawara K. Influenza virus peptides specifically bound to cynomolgus macaque major histocompatibility complex class I Mafa-A1\*5202. 第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ (千葉県)

⑤ Itoh Y, Arikata M, Maeda T, Shiina T, Ishigaki H, Takada A, Okamatsu M, Sakoda Y, Nakayama M, Kida H, Ogasawara K. Identification of pandemic influenza virus NP peptides bound to cynomolgus macaque MHC class I Mafa-A1\*5202 and stimulating CTL responses. XV International Congress of Virology. September 15, 2011, 札幌コンベンションセンター (北海道)

⑥ Itoh Y, Okamatsu M, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Ishida H, Arikata M, Pham, VL, Soda K, Kida H, Ogasawara K. An inactivated whole particle vaccine from a non-pathogenic virus library confers protective immunity against H1N1 pandemic influenza virus more effectively than dose a split vaccine in cynomolgus macaques. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, August 24, 2010 神戸国際展示場 (兵庫県)

⑦ 伊藤靖、石垣宏仁、仲山美沙子、小笠原一誠、河岡義裕：カニクイザルモデルを用いたパンデミック（H1N1）2009 インフルエンザウイルス感染による炎症反応の解析、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27 日、京王プラザホテル新宿（東京都）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 靖 (ITO YASUSHI)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90324566

### (2) 研究分担者

小笠原 一誠 (OGASAWARA KAZUMASA)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20169163  
伊藤 睦美 (ITO MUTSUMI)  
東京大学・医科学研究所・技術職員  
研究者番号：80573906

### (3) 連携研究者

高田 礼人 (TAKADA AYATO)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授  
研究者番号：10292062