

199800447A

厚生省

平成十年度

厚生科学研究費補助金  
高度先端医療研究事業

人工免疫グロブリン等の開発に関する研究班

研究報告書

主任研究者 松浦善治

# 総括研究報告書

## 人工免疫グロブリン等の開発に関する研究

主任研究者 松浦善治 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

### 研究要旨

C型肝炎ウイルス (HCV) に対する中和活性を持った人工免疫グロブリンを遺伝子組換え技術で大量に供給し、未だ有効な治療法のないC型肝炎対策に応用することを目的に研究を進めている。HCV のエンベロープ遺伝子に抗体で認識可能なタグを付加した組換え遺伝子を作製し、この組換え蛋白を持続的に分泌発現できる細胞株を樹立した。これによりタグに対する抗体で容易に精製ができ、しかもエンベロープ蛋白の細胞への結合をこの抗体で検出することが可能となった。また、T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターを作製し、高感度細胞融合活性検出系を構築した。この系を用いてエンベロープ蛋白の細胞表面への結合阻止だけでなく細胞融合活性を阻害できる抗体の検索が可能となった。HCV の中和抗体の二次評価系として、HCV 粒子に対する結合能を検討するため、組換えバキュロウイルスでHCV のウイルス様粒子の産生条件を検討した。また、我々が用いているファージディスプレイ法の確認のため行った、ヒトサイトメガロウイルスとB型肝炎ウイルス表面抗原に対するヒト抗体遺伝子のクローニングは成功し、この系の有効性は証明された。これらの経験をもとに、慢性HCV から自然治癒した患者の血液を材料に、HCV に対して中和活性を保持したヒト抗体遺伝子のクローニングを進めている。

### 分担研究者

石井孝司 国立感染症研究所、研究員  
鈴木哲朗 国立感染症研究所、主任研究員  
井原征二 東海大学医学部、助教授

ることが示されている。これらの抗体はヒトとマウスのキメラ抗体であり、繰り返しの使用はできなかった。そこで”キメラ抗体”でも”ヒト化抗体”でもないHCVの感染を中和できる”ヒト抗体”を作製し大量に供給できれば、HCV感染者にとって福音となると思われる。

### A. 研究目的

我が国には百万人以上ものHCVキャリアーが存在し、さらにHCV感染と肝臓発症の相関が血清疫学的に証明されており、既感染者の発症予防やウイルスの排除法の確立が強く望まれている。非常に稀ではあるが、慢性C型肝炎からインターフェロン (IFN) 等の治療なしに自然に治癒することがある。この様な例ではエンベロープ蛋白が哺乳動物細胞へ結合するのを阻止する抗体 (結合阻止抗体) が高率に出現することから、この抗体がHCVの生体からの排除に重要な役割を演じていることが示唆された。そこで、この様な中和活性を持った人工免疫グロブリンを遺伝子組換え技術で大量に供給できれば、有効性や副作用等の問題の多いインターフェロン治療以外に未だ打つ手のない、C型肝炎対策に極めて有望な手段になるものと思われる。人工抗体はこれまでに、血小板凝集阻害剤や非ホジキン病の抗体医薬として有効であ

### B. 研究方法

#### 1. イムノタグを付加したHCVエンベロープ蛋白の発現と解析

感染研にてクローニングしたHCV (J1 株) のE2領域のC端に存在する疎水性ドメインをE-Tag (ファルマシア) に置換し、tPAシグナルシーケンスをN端に付加して、dhfrプロモーターの下流に挿入したプラスミドを作製した。このプラスミドをCHO細胞にトランスフェクションし、E2を恒常的に発現している細胞株を樹立し、培養上清中からの目的蛋白の精製を検討する。また、同様の手法を用いて、E1領域を恒常的に発現している細胞株、および、E1とE2の両方を同時に発現する細胞株の樹立も試みる。

#### 2. リポータ遺伝子の活性化を指標にした細胞融合検出系の構築

HIV の co-receptor のクローニングに用いられた、高感度細胞融合活性検出系を構築するため、まず。動物細胞に効率よく HCV のエンベロップ蛋白及び T7RNA ポリメラーゼを発現できるバキュロウイルスおよび非増殖型アデノウイルスベクターの開発を試みた。次にこのウイルスを用いて、ドナー細胞に HCV のエンベロップ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、レシーピエント細胞には T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入しておく。両者を混合培養し、もし両細胞間で融合が生じれば T7 ポリメラーゼによってルシフェラーゼ遺伝子が発現され、肉眼で観察するよりもかなり高感度に細胞融合を検出できる。この系を用いてエンベロップ蛋白の細胞表面への結合だけでなく細胞融合を阻害できる抗体の検出を試みる。

### 3. 組換えバキュロウイルスによる HCV VLP の作製

バキュロウイルストランスファクター pAcYM1 の SmaI 部位に HCV type1b の cDNA を挿入し、致死欠損ウイルス DNA とともに昆虫細胞にトランスフェクトした。培養 3 日目の培養上清を採取しプラークアッセイを行い組換えウイルスを選択した。HCV 構造蛋白遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ、3 日間培養後に細胞を回収し 0.1% NP-40 を含むトリス緩衝液に懸濁、超音波処理し細胞抽出液を調製した。これをショ糖密度勾配液上に重層して遠心後、分画採取した。各フラクションについてウエスタンブロット法を行い HCV 蛋白が確認された画分について一部ネガティブ染色し電子顕微鏡下で VLP を観察した。

### 4. ファージディスプレイ法

目的抗体遺伝子をより効率的にクローニングするために、B 細胞に EBV を感染させ不死化細胞を樹立する方法を用いた。HCMV 陽性者 B 細胞の場合は EBV 感染後 3 週間培養し、オリゴクローン状態の抗体産生細胞から抗体ライブラリーを作製し、パニングにより中和抗体をスクリーニングした。HBV の場合は、EBV 感染後長期間培養し、抗 HBs 抗体産生モノクローン細胞 (CL4) の樹立に成功している。まず、抗体陽性者の末梢血より B リンパ細胞を分画し、EBV を感染する。 $10^4 \sim 10^5$  細胞を 96 穴プレートにまき培養を続け、培養上清に目的抗体を分泌している穴を探す。陽性細胞群から RNA を抽出して RT-PCR で抗体ライブラリーを作成する。この方法では、抗体産生陽性の細胞

群のみを対象にすること、また計算上はライブラリーサイズは小さくなるため、クローニング効率は良くなると考えられる。次に、増幅した L 鎖と H 鎖 Fd の DNA 断片を発現ベクター pRPLS/Fab-I にクローニングする。抗体分子は M13 ファージの第 III 遺伝子産物と融合したかたちでファージ粒子面に発現するように設計してある。DNA 断片を結合した pRPLS/Fab-I は大腸菌に導入し、ヘルパー M13 ファージを感染し、抗体分子を発現した M13 ファージを回収する。また、パニング及び ELISA に用いる抗原は、HCMV の場合は感染細胞抽出液を、HBV は精製 HBs を用いた。これらの抗原に、抗体を発現している M13 ファージを結合させ、2 次選択に使用する。3 回の選択を繰り返し、目的抗体を発現しているファージを濃縮する。最終の選択で残ったファージの各クローンをさらにスクリーニングをかける。

### C. 研究結果

1. E2 蛋白は E-Tag との融合蛋白として培養上清中に効率よく分泌された。培地は無血清のものを使用できるため、分泌された融合蛋白は、抗 E-Tag 抗体カラムを用いて高純度にアフィニティ精製することができた。精製した蛋白が Molt-4 に結合するかどうかを FACS を用いて解析し、実際にアッセイに使えることを確認した。さらに E2 蛋白の細胞表面上の結合分子として同定されている CD81 を過剰発現する細胞株にも、効率よく結合する事を確認した。

2. 動物細胞に効率よく遺伝子を導入できる非増殖型ウイルスベクターの開発

ニフトリのアクチンプロモーターと CMV のエンハンサーからなる CAG プロモーターの下流にリポーター遺伝子を挿入したバキュロウイルスおよび非増殖型アデノウイルスを作製し、各種動物細胞への遺伝子導入を試みた。その結果バキュロウイルスは、ヒト肝細胞のみならず、ヒト子宮頸癌細胞、サル腎細胞、ブタ腎細胞など多くの哺乳動物細胞へも遺伝子の導入が可能であることが示された。そこで T7RNA ポリメラーゼおよび HCV 遺伝子を発現する組換えウイルスを作製し、各種培養細胞でこれらの遺伝子を発現できることが確認できた。

3. リポーター遺伝子の活性化を指標にした細胞融合検出系の開発

ドナー細胞に上記の組換えウイルスを用いて HCV のエンベロップ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現

させ、レシーピエント細胞にはT7プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入し、両者を混合培養し、細胞融合の有無を各種細胞で検討した。その結果ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞が HCV のエンベロープ蛋白を発現している細胞と融合することが明らかとなった。

#### 4. 組換えバキュロウイルスによるHCV VLP の作製

構造蛋白質を昆虫細胞で発現させ分画後、電子顕微鏡下で観察したところウイルス粒子様の構造物が検出され、この発現系によって確かに HCV VLP が産生されることが確認された。しかし、得られた VLP は極めて微量であり、抗体クローンの粒子結合実験に利用するにはその産生効率を大幅に上昇させなければならない。そこで次に、構造蛋白領域に加えその C 末端側に存在する p7、NS2 及びセリンプロテアーゼ活性を有する NS3 を含んだ領域、さらにその一部を欠失させたバキュロウイルスを作製した。得られた組換えウイルスからの HCV 構造蛋白及び NS3 蛋白の発現はウエスタンブロット法で確認した。同様にして、NS3 プロテアーゼ領域のみを発現するバキュロウイルスも調製した。これらの組換えウイルスを組み合わせて細胞に共感染させ、細胞内で発現した NS3 プロテアーゼが構造蛋白をプロセスさせることによって、発現効率の向上を試みたが、VLP の産生は改善されなかった。

#### 5. 抗 HCMV 抗体

最終パニングで残った各クローンを、HCMV 抗原を用いた ELISA でスクリーニングをおこなった結果、6 クローンが反応した。このうちの 1 株、Cl.13-3、は特に強く反応した。Cl.13-3 は蛍光抗体法で非感染 HEL 細胞には反応しないが HCMV 感染細胞には反応した。また、感染初期には反応が見られず、感染後期細胞と反応すること、その他から Cl.13-3 は感染後期の蛋白質を認識することが判明した。しかし、免疫沈殿や Western blot 分析で特異蛋白を同定することはできなかった。さらに、Cl.13-3 は HCMV Towne 株のみならず AD169 株も中和することから、スペクトルは広いことが判明した。また Cl.13-3 は 1 mg/ml でウイルスの感染価を半減させる能力を持っていた。

#### 6. 抗 HBs 抗体

CL4 細胞は抗 HBs 抗体陽性者 B 細胞に EBV を感染し、長期間培養を続けた結果得られた HBs 抗原と強く反応するモノクローン 抗体産生株である。

この株より RNA を抽出し、RT-PCR によって  $\gamma$  鎖および  $\kappa$  鎖の Fab 領域を増幅した。PCR 産物は pFab-His2 ベクターにクローニングした。これを大腸菌にトランスフォームし、生じたコロニーについて培養をおこない IPTG 誘導後、菌体破碎液の上清を Fab 抗体試料とし分析した。この結果抗 HBsFab 抗体 CL4-3 が分離できた。CL4-3 は HBs を産生している Alexander cell に反応した。また、CL4-3 は Fab 抗体であるが、HBs に対する親和性は親株 CL4 の whole 抗体と同程度の活性を示した。現在治療に使われている抗 HBs 免疫グロブリン製剤と FabCL4-3 を ELISA で活性比較をおこなった結果、グロブリン製剤の 1 units に Fab 抗体 CL4-3 の 20ng が相当した。親株の CL4 では EBV が感染しているため、抗体を精製しても治療への使用は不許可となるが、今回得られた結果が示すように、FabCL4-3 は EBV は free であり、少量で高い活性を示すことから、今後、人の HBV 感染症治療への使用が期待できる。現在日本の企業 2 社と中国政府機関とで工業化と中国での使用が検討されている。

#### 7. 抗 HCV 抗体

HCV 感染から自然治癒し、NOB 抗体陽性患者の B 細胞に上記の方法を適用して、NOB 関連抗体遺伝子の分離をめざした。しかし、NOB 陽性患者の B 細胞に EBV を感染させる実験を繰り返しおこなったが、不死化細胞わずかしか生ぜず、しかもこれらの細胞には NOB 活性は検出できなかった。EBV 感染で不死化細胞が樹立できない事は希に生ずるが、主治医に問い合わせたところ、同患者は継続的に免疫抑制剤が投与されていることが判明した。我々の経験から、免疫抑制剤は T 細胞のみならず B 細胞にも影響すると考えられ、不死化細胞が樹立できなかった原因がここにある可能性がある。なお同患者の血液材料から、抗体ライブラリーは作製してある。今後、精製 E2 抗原を用いてファージディスプレイ法により NOB 関連抗体遺伝子の分離をめざす。

#### D. 考察

NOB 抗体のアッセイに多量に必要となる可溶性 E2 蛋白を発現し、精製する手段を確立した。本蛋白は C 端に E-Tag の配列が付加されており、アフィニティカラムを用いて容易に精製することができ、しかも標的細胞への結合に関してもまったく影響を与えなかった。今後は同細胞の大量培養法を確立し、組換え NOB 抗体のスクリーニングに対応できる量の組換えエンベロープ蛋白を調製する。E2

蛋白は、ウイルス粒子中で E1 蛋白と結合していること考えられているため、E1 と E2 の両方を同時に発現する細胞株の樹立を今後進めていきたい。E1 と E2 の結合により、E2 単独で発現させる場合よりもより天然の HCV のエンベロープ蛋白に近い立体構造をとる可能性があることが考えられ、E1 と E2 の複合体は、CD81 と E2 の結合様式の詳細な解析にも応用することが期待できる。また、今回開発した非増殖型バキュロウイルス及びアデノウイルスベクターは、細胞傷害性が弱いため、遺伝子の機能を長期間観察するのに適しており、T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターは高感度細胞融合活性の検出に有力なツールとなった。これらのウイルスを用いた高感度細胞融合活性検出系により、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞に HCV のエンベロープ蛋白に結合し細胞融合を許容する分子が存在することが示唆された。今後この分子の解析を進めていく。

組換えバキュロウイルスを用いて HCV VLP が産生されることが確認された。今後、各種組換えバキュロウイルスを細胞に共感染させ、効率よく構造蛋白が成熟し VLP が細胞外に放出される条件を検討していく。

抗体遺伝子のクローニングで我々が直面している大きな問題点は、日本では血液が少量しか利用できないことにある。欧米では、10 L の血液から成分分離器で B 細胞を精製したり、2 L の血液から RNA を調製した例が報告されているが、この規模の B 細胞からは精製 mRNA が大量に得られ、大きなサイズの抗体ライブラリーが作製されている。しかし我々の環境では、抗体価の高い患者が見つかって、最大で 30ml の血液しか得られず、ほとんどの場合は 10ml 以下であった。本年度の研究で、EBV 感染とファージディスプレイ法を組み合わせることで、少量の血液でヒト抗体遺伝子のクローニングが可能であることが明らかとなった。

## E. 結語

1. HCV のエンベロープ遺伝子に抗体で認識可能なタグを付加した組換え遺伝子を作製し、この組換え蛋白を持続的に分泌発現できる細胞株を樹立した。
2. T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターを作製し、高感度細胞融合活性検出系を構築した。この系でヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞に HCV のエンベロープ蛋白に結合し

細胞融合を許容する分子が存在することが示された。

3. HCV エンベロープ蛋白に対する結合活性を有する抗体クローンの二次評価系として HCV 粒子に対する結合能を検討した。

4. ファージディスプレイ法を構築しヒト抗体作製を目指して研究を行ってきた。現在までに、HCMV 中和抗体、HBs 抗体のヒト抗体の分離に成功したが、HCV NOB 関連抗体は得られなかった。しかし、問題点は一つ一つ解決している。今後も、臨床で使用できる強い中和活性を持つヒトモノクローナル抗体の作製を目的とした努力を続けていく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(主任研究者)

Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. *Virology*, 254, 315-323, 1999.

Okuma K., Nakamura M., Nakano S., Yanagi Y., Niho Y., and Matsuura Y. Host range of human T-cell leukemia virus type I analyzed by a cell fusion-dependent reporter gene activation assay. *Virology*, 254, 235-244, 1999.

Ishii K., Tanaka Y., Yap C.C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. Enzymatic activity of hepatitis C virus RNA polymerase mutants with deletions and amino acid changes in the conserved motifs. *Hepatology*, 29, 1227-1235, 1999.

Yamada K., Mori A., Seki M., Kimura J., Yuasa S., Matsuura Y., and T. Miyamura. Critical point mutations which caused loss of the NS3 proteinase activity of hepatitis C virus. *Virology*, 246, 104-112, 1998.

Yap C.C., Ishii K., Aizaki H., Tani H., Aoki Y., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors. *J. Gen. Virol.*, 79, 1879-1888, 1998.

Hiasa Y., Horiike N., Fazle S.M., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y., Onji M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 90-95, 1998.

Moriya K., Fujie H., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Tsutsumi T., Ishibashi K., Matsuura Y., Kimura S.,

- Miyamura T., and Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Med.*, 4, 1065-1067, 1998.
- Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 28, 1117-1120, 1998.
- Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Saito I., Matsuura Y., and Miyamura T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology*, 250, 140-150, 1998.
- Aizaki, H. Aoki Y., Harada T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Cloning of a full length cDNA of hepatitis C virus from an infectious blood sample. *Hepatology*, 27, 621-627, 1998.
- 松浦善治、宮村達男、C型肝炎ワクチン、治療学、32, 1497-1500, 1998.
- 松浦善治、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、C型肝炎ウイルスワクチンの開発、カレントセラピー、16, 2077-2082, 1998.
- 松浦善治、宮村達男、C型肝炎ウイルスワクチン、Bio Clinica, 13, 393-397, 1998.
- (分担研究者)
- Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. *Virology*, 254, 315-323, 1999.
- Ishii K., Tanaka Y., Yap C.C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. Enzymatic activity of hepatitis C virus RNA polymerase mutants with deletions and amino acid changes in the conserved motifs. *Hepatology*, 29, 1227-1235, 1999.
- Yap C.C., Ishii K., Aizaki H., Tani H., Aoki Y., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors. *J. Gen. Virol.*, 79, 1879-1888, 1998.
- Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 28, 1117-1120, 1998.
- Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Saito I., Matsuura Y., and Miyamura T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology*, 250, 140-150, 1998.
- Aizaki, H. Aoki Y., Harada T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Cloning of a full length cDNA of hepatitis C virus from an infectious blood sample. *Hepatology*, 27, 621-627, 1998.
- Takekoshi M., Maeda F., Tachibana H., Inoko H., Kato S., Takakura I., Kenjyo T., Hiraga S., Ogawa Y., Horiki T., and Ihara S., Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J. Virol. Methods*, 74, 89-98, 1998.
- Tachibana H., Takekoshi M., Cheng X-J., Maeda F., Aotsuka S., and Ihara S., Bacterial expression of a neutralizing mouse monoclonal antibody Fab fragment to a 150-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 35-40, 1999.
- Tachibana H., Cheng X-J., Watanabe K., Takekoshi M., Maeda F., Aotsuka S., Kaneda Y., and Ihara S., Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, in press.
- Maeda F., Nagatsuka Y., Ihara S., Aotsuka S., Ono Y., Inoko H., and Takekoshi M., Bacterial expression of recombinant human monoclonal antibody Fab fragment to hepatitis B surface antigen. *J. Med. Virol.*, in press.
- 井原征治、前田史子、竹腰正隆、大腸菌発現系でのヒト抗サイトメガロウイルス中和抗体の作製、日本臨床、56巻、161-166, 1998.
2. 学会発表  
(主任研究者)
- Matsuura Y., Takeda N., and Miyamura T. : Development of HCV and HEV Vaccines, 3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, March 28-30, 1998, Bali, Indonesia.
- Matsuura Y., and Miyamura T.: Characterization of hepatitis C virus core protein. 2nd International Virus Assembly Symposium. April 4-9, 1998, Las Palmas, Spain.
- Matsuura Y., and Miyamura T.: Use of recombinant

- baculoviruses for gene expression in mammalian cells. 2nd Japan-Germany Virology Symposium. May 10-15, 1998, Marburg, Germany.
- Ishii K., Tamura K., Tsutsumi T., Aizaki H., Suzuki R., Matsuura Y., and Miyamura T.: Biochemical evidence of the presence of cytoplasmic domain in HCV E1 glycoprotein. 5th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June 24-28, 1998, Venice, Italy.
- Shoji I., Sato M., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T.: Further cleavage of HCV NS3 protein. 同上.
- Tani H., Ishii K., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T.: Apoptosis induced by transiently expressed HCV proteins. 同上.
- Yap C.-C., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T.: Coinfection system consisting of replication-deficient viral vectors for expression of HCV RNA. 同上.
- Matsuura Y., Ishii K., Aizaki H., Takigawa S., Tani H., Whitt M.A., and Miyamura T.: Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. 同上.
- Matsuura Y.: Use of recombinant baculoviruses for gene expression in mammalian cells, 農林水産省蚕糸昆虫研究所、COE 国際シンポジウム, 1998 年 10 月、筑波。
- 松浦善治、鈴木亮介、滝川慎吾、相崎英樹、石井孝司、Michael A. Whitt、宮村達男：HCV エンベロープ蛋白を持ったシュードタイプ VSV の作製、第45回日本ウイルス学会, 1998 年 10 月、東京。
- 石井孝司、田村幸太郎、堤 武也、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白 E1 の小胞体膜状での構造解析、同上。
- 谷 英樹、牛島廣治、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男：新規バキュロウイルスによる哺乳動物細胞での高度遺伝子発現系の構築、同上。
- 下池貴志、相崎英樹、谷 英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男：HCV コア蛋白質による HCV RNA の特異的翻訳阻害、同上。
- 小長谷昌功、斎藤早久良、宮嶋直子、荻野利夫、相崎英樹、松浦善治、宮村達男：HCV 蛋白の発現によるインターフェロン感受性の変化、同上。
- 大隈 和、中村 稔、中野修治、仁保喜、松浦善治：HTLV-I エンベロープ糖蛋白の細胞融合機構の解析、同上。
- 亀井 昭、松浦善治、宮村達男、垣内雅彦、保富康宏：C型肝炎ウイルス(HCV) DNA のマウス肝臓内接種による HCV 感染モデルでの細胞障害性 T リンパ球の誘導、同上。
- 松浦善治：HCV のエンベロープ蛋白を持ったシュードタイプ VSV、文部省科学研究費シンポジウム, RNA ウイルス研究の新展開, 1998 年 10 月、愛知。
- 田村幸太郎、石井孝司、鈴木哲朗、真鍋 昇、宮本 元、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスコア蛋白とエンベロープ蛋白の相互作用、第21回日本分子生物学会年会, 1998 年 12 月、横浜。
- 田中義信、石井孝司、下池貴志、鈴木哲朗、牛島廣治、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスのコア蛋白質と合成オリゴヌクレオチドとの相互作用、同上。
- 下池貴志、相崎英樹、谷 英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男：HCV コア蛋白質による HCV RNA の特異的翻訳阻害、同上。
- 谷 英樹、牛島廣治、松浦善治、宮村達男：新規バキュロウイルスベクターによる哺乳動物細胞への高度遺伝子導入、同上。
- (分担研究者)
- 竹腰正隆、安達暁子、増井 理、前田史子、井原征治、ヒトサイトメガロウイルスに対する組換えヒト中和抗体の作製、第13回ヘルペスウイルス研究会, 1998.
- 前田史子、竹腰正隆、長塚靖子、小野 魁、井原征治、ヒト抗HBsモノクローナル抗体カクテル調整の試み、第46回日本ウイルス学会総会, 1998.
- 前田史子、竹腰正隆、長塚靖子、小野 魁、井原征治、オリゴクローンよりの抗HBsヒトモノクローナル抗体の調整、第21回日本分子生物学会年会, 1998.
- 竹腰正隆、前田史子、長塚靖子、小野 魁、井原征治、オリゴクローン法による抗TNF- $\alpha$ ヒトモノクローナル抗体の作製、同上。
- 長塚靖子、竹腰正隆、前田史子、井原征治、小野 魁、交差反応性により新しい9-O-アセチル化ガングリオシドを認識するヒト抗 i 単クローン抗体GL-2の大腸菌発現系への転換、第8回日本免疫学会総会, 1998.
- 橘 裕司、程 訓佳、渡辺勝臣、金田良雅、竹腰正隆、前田史子、井原征治、赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌

による作製, 第67回日本寄生虫学会, 1998.

Tachibana H., Cheng X-J., Watanabe K., Kaneda Y.,  
Takekoshi M., Maeda F., Ihara S., Bacterial  
expression of human monoclonal antibody Fab  
fragments specific for *Entamoeba histolytica*, 47 th  
Parasitology International, 1998.



## 分担研究報告書

### 人工免疫グロブリン等の開発に関する研究

分担研究者 石井孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部研究官

#### 研究要旨

我々はこれまでに慢性C型肝炎から自然治癒した症例において、C型肝炎ウイルス (HCV) のエンベロープ蛋白がヒト細胞へ結合するのを阻止する抗体 (NOB 抗体) が高率に存在する事を明らかにした。本抗体は、HCV の生体からの排除に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆される。このアッセイ系にはHCVのエンベロープ蛋白とそれに対する特異抗体を大量に必要とする。そこで HCV のエンベロープ遺伝子に抗体で認識可能なタグを付加した組換え遺伝子を作製し、この組換え蛋白を持続的に分泌発現できる細胞株を樹立した。これによりタグに対する抗体で容易に精製ができ、しかもエンベロープ蛋白の細胞への結合をこの抗体で検出することが可能となった。また、T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターを作製し、高感度細胞融合活性検出系を構築した。この系を用いてエンベロープ蛋白の細胞表面への結合阻止だけでなく細胞融合活性を阻害できる抗体の検索が可能となった。

#### A. 研究目的

HCV は、輸血後肝炎の原因ウイルスとして公衆衛生上極めて重要な病原ウイルスであり、また、HCV 感染と肝癌発症の高い相関も明らかにされている。HCV 感染の高感度な診断系の開発により、輸血による感染者は激減したが、すでに多くのキャリアーが存在しているため、既感染者の発症予防やウイルスの排除法の確立が急務である。我々は HCV の慢性感染から自然治癒した症例において、HCV のエンベロープ蛋白がヒト細胞へ結合するのを阻止する抗体 (NOB 抗体) が高率に存在する事を明らかにした。NOB 抗体は、HCV の生体からの排除に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆されるため、遺伝子工学的手法を用いて、NOB 活性を有するヒト型抗体の作製についての研究を進めている。この抗体のアッセイのためには精製した HCV のエンベロープ蛋白 (E1 及び E2) とこれに対する抗体 (これまで組換えエンベロープ蛋白で高度に免疫したチンパンジー血清を使用していた) を多量に必要とする。今回我々は、エンベロープ蛋白 (E2) に特異抗体が認識できるタグ (E-Tag) を付加した組換え蛋白を持続的に分泌発現する細胞株を確立し、このタグに対する抗体でエンベロープ蛋白をアフィニティー精製し、得られた標品が NOB アッセイに使用できるかどうかを検討する。また、HIV の co-receptor のクロー

ニングに用いられた、高感度細胞融合活性検出系を構築するため、動物細胞に効率よくHCVのエンベロープ蛋白及び T7RNA ポリメラーゼを発現できるバキュロウイルスおよび非増殖型アデノウイルスベクターの開発を試みる。この系を用いてエンベロープ蛋白の細胞表面に存在すると思われるリセプターへの結合だけでなく細胞融合活性を阻害できる抗体のアッセイを進める。

#### B. 研究方法

1. 感染研にてクローニングしたHCV (J1 株) の E2 領域の C 端に存在する疎水性ドメインを E-Tag (ファルマシア) に置換し、tPA シグナルシーケンスを N 端に付加して、dhfr プロモーターの下流に挿入したプラスミドを作製した。このプラスミドを CHO 細胞にトランスフェクションし、E2 を恒常的に発現している細胞株を樹立し、培養上清中からの目的蛋白の精製を検討する。また、同様の手法を用いて、E1 領域を恒常的に発現している細胞株、および、E1 と E2 の両方を同時に発現する細胞株の樹立も試みる。
2. リポータ遺伝子の活性化を指標にした細胞融合検出系の構築。HIV の co-receptor のクローニングに用いられた、高感度細胞融合活性検出系を構築するため、まず、動物細胞に効率よくHCVのエンベロープ蛋白及び T7RNA ポリメラーゼを発現で

きるバキュロウイルスおよび非増殖型アデノウイルスベクターの開発を試みた。次にこのウイルスを用いて、ドナー細胞に HCV のエンベロップ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、レシーピエント細胞には T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入しておく。両者を混合培養し、もし両細胞間で融合が生じれば T7 ポリメラーゼによってルシフェラーゼ遺伝子が発現され、肉眼で観察するよりもかなり高感度に細胞融合を検出できる。この系を用いてエンベロップ蛋白の細胞表面への結合だけでなく細胞融合を阻害できる抗体の検出を試みる。

### C. 研究結果

1. E2 蛋白は E-Tag との融合蛋白として培養上清中に効率よく分泌された。培地は無血清のものを使用できるため、分泌された融合蛋白は、抗 E-Tag 抗体カラムを用いて高純度にアフィニティ精製することができた。精製した蛋白が Molt-4 に結合するかどうかを FACS を用いて解析し、実際にアッセイに使えることを確認した。さらに E2 蛋白の細胞表面上の結合分子として同定されている CD81 を過剰発現する細胞株にも、効率よく結合する事を確認した。

2. 動物細胞に効率よく遺伝子を導入できる非増殖型ウイルスベクターの開発

ニワトリのアクチンプロモーターと CMV のエンハンサーからなる CAG プロモーターの下流にリポーター遺伝子を挿入したバキュロウイルスおよび非増殖型アデノウイルスを作製し、各種動物細胞への遺伝子導入を試みた。その結果バキュロウイルスは、ヒト肝細胞のみならず、ヒト子宮頸癌細胞、サル腎細胞、ブタ腎細胞など多くの哺乳動物細胞へも遺伝子の導入が可能であることが示された。そこで T7RNA ポリメラーゼおよび HCV 遺伝子を発現する組換えウイルスを作製し、各種培養細胞でこれらの遺伝子を発現できることが確認できた。

3. リポーター遺伝子の活性化を指標にした細胞融合

ドナー細胞に上記の組換えウイルスを用いて HCV のエンベロップ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、レシーピエント細胞には T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入し、両者を混合培養し、細胞融合の有無を各種細胞で検討した。その結果ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞が HCV のエンベロップ蛋白を発現している細胞と融合することが明らかとなっ

た。

### D. 考察

NOB 抗体のアッセイに多量に必要な可溶性 E2 蛋白を発現し、精製する手段を確立した。本蛋白は C 端に E-Tag の配列が付加されており、アフィニティカラムを用いて容易に精製することができ、しかも標的細胞への結合に関してもまったく影響を与えなかった。今後は同細胞の大量培養法を確立し、組換え NOB 抗体のスクリーニングに対応できる量の組換えエンベロップ蛋白を調製する。E2 蛋白は、ウイルス粒子中で E1 蛋白と結合していると考えられているため、E1 と E2 の両方を同時に発現する細胞株の樹立を今後進めていきたい。E1 と E2 の結合により、E2 単独で発現させる場合よりもより天然の HCV のエンベロップ蛋白に近い立体構造をとる可能性があることが考えられ、E1 と E2 の複合体は、CD81 と E2 の結合様式の詳細な解析にも応用することが期待できる。

また、今回開発した非増殖型バキュロウイルス及びアデノウイルスベクターは、細胞傷害性が弱いと、遺伝子の機能を長期間観察するのに適しており、T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターは高感度細胞融合活性の検出に有力なツールとなった。これらのウイルスを用いた高感度細胞融合活性検出系により、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞に HCV のエンベロップ蛋白に結合し細胞融合を許容する分子が存在することが示唆された。今後この分子の解析を進めていく。

### E. 結語

1. HCV のエンベロップ遺伝子に抗体で認識可能なタグを付加した組換え遺伝子を作製し、この組換え蛋白を持続的に分泌発現できる細胞株を樹立した。
2. T7RNA ポリメラーゼを発現できる非増殖型ウイルスベクターを作製し、高感度細胞融合活性検出系を構築した。
3. ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞に HCV のエンベロップ蛋白に結合し細胞融合を許容する分子が存在することが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Ishii K., Tanaka Y., Yap C.C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. Enzymatic activity of hepatitis

- C virus RNA polymerase mutants with deletions and amino acid changes in the conserved motifs. *Hepatology*, 29, 1227-1235, 1999.
- Yap C.C., Ishii K., Aizaki H., Tani H., Aoki Y., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors. *J. Gen. Virol.*, 79, 1998, 1879-1888.
- Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 28, 1117-1120, 1998.
- Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Saito I., Matsuura Y., and Miyamura T. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. *Virology*, 250, 140-150 1998.
- Aizaki, H. Aoki Y., Harada T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Cloning of a full length cDNA of hepatitis C virus from an infectious blood sample. *Hepatology*, 27, 621-627, 1998.
- 松浦善治、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、C型肝炎ウイルスワクチンの開発、カレントセラピー、16, 2077-2082, 1998.
2. 学会発表
- Ishii K., Tamura K., Tsutsumi T., Aizaki H., Suzuki R., Matsuura Y., and Miyamura T.: Biochemical evidence of the presence of cytoplasmic domain in HCV E1 glycoprotein. 5th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June 24-28, 1998, Venice, Italy.
- Yap C.-C., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T.: Coinfection system consisting of replication-deficient viral vectors for expression of HCV RNA. 同上.
- Matsuura Y., Ishii K., Aizaki H., Takigawa S., Tani H., Whitt M.A., and Miyamura T.: Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. 同上.
- 松浦善治、鈴木亮介、滝川慎吾、相崎英樹、石井孝司、Michael A. Whitt、宮村達男：HCV エンベロープ蛋白を持ったシュードタイプ VSV の作製、第45回日本ウイルス学会、1998年10月、東京。
- 石井孝司、田村幸太郎、堤武也、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白 E1 の小胞体膜状での構造解析、同上。
- 田村幸太郎、石井孝司、鈴木哲朗、真鍋昇、宮本元、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスコア蛋白とエンベロープ蛋白の相互作用、第21回日本分子生物学会年会、1998年12月、横浜。
- 田中義信、石井孝司、下池貴志、鈴木哲朗、牛島廣治、松浦善治、宮村達男：C型肝炎ウイルスのコア蛋白質と合成オリゴヌクレオチドとの相互作用、同上。

## 分担研究報告書

### 人工免疫グロブリン等の開発に関する研究

分担研究者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

#### 研究要旨

HCVエンベロープ蛋白に対する結合活性を有する抗体クローンの二次評価系として HCV 粒子に対する結合能を検討した。最近、HCV の構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスでウイルス様粒子 (virus-like particle: VLP) が作られることが報告されたが、その産生性は極めて低く、抗体結合実験のための必要量を得るのは難しいと考えられた。一方、近縁のフラビウイルスでは、構造蛋白とウイルスプロテアーゼを共発現させると構造蛋白の一部がプロテアーゼによって切断され成熟化が進み、形成された VLP が効率よく培養上清中に放出されることが知られている。そこで、HCV についても同様の可能性を考え構造蛋白 (コア-E1-E2) 及び NS3 プロテアーゼ領域を発現する種々の組換えバキュロウイルスを作製し、HCV 蛋白の発現をウエスタンブロット法で確認した。今後、効率よく VLP が産生される感染、培養条件をセットアップし細胞内あるいは培養上清から VLP を調製していく。

#### A. 研究目的

現在、共同研究者らによって、精製した HCV エンベロープ蛋白に対する結合阻害活性を指標として組換え抗体をスクリーニングしている。得られた抗体クローンが、単離されたエンベロープ蛋白だけでなく HCV 粒子ともどの程度効率よく結合するかの評価は重要であるが、ウイルス複製効率の低さなどのため HCV 粒子を大量に調製するのは困難な状況にある。一方、HCV の構造蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを利用して HCV の VLP が産生し得ることが最近報告された。しかしながらその産生性は極めて低く、抗体結合実験のための必要量を得るのは難しいと考えられる。HCV と近縁のフラビウイルスでは、ウイルスの NS3 プロテアーゼが構造蛋白の一部を切断することが知られており、実際コア蛋白の C 末端、PreM、E 蛋白を含むポリプロテインと NS3 プロテアーゼを共発現させると、培養上清中に VLP が効率よく放出される。そこでバキュロウイルス発現系を用い、HCV の構造蛋白が昆虫細胞内で NS3 プロテアーゼによってプロセスされうる形で産生させることによって、効率の良い VLP 作製系の確立を目指す。

#### B. 研究方法

組換えバキュロウイルスの作製：

トランスファーベクター pAcYM1 の SmaI 部位に HCV type1b の cDNA を挿入し、致死欠損ウイルス DNA とともに昆虫細胞 Sf9 にトランスフェクトした。培養3日目の培養上清を採取しプラークアッセイを行い組換えウイルスを選択した。

HCV蛋白の発現及びVLPの調製：

HCV 構造蛋白遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 に感染させ、3日間培養後に細胞を回収し 0.1% NP-40 を含むトリス緩衝液に懸濁、超音波処理し細胞抽出液を調製した。これをショ糖密度勾配液上に重層して遠心後、分画採取した。各フラクションについてウエスタンブロット法を行い HCV 蛋白が確認された画分について一部ネガティブ染色し電子顕微鏡下で VLP を観察した。

#### C. 研究結果と考察

まず、当研究室ですでに保有している組換えバキュロウイルスを用いて HCV VLP の検出を試みた。構造蛋白質：コア-E1-E2 を Tn5 細胞で発現させ上記のように分画し、電子顕微鏡下で観察したところウイルス粒子様の構造物が検出されたことから、この発現系によって確かに HCV VLP が産生されることが確認された。しかし、得られた VLP は極めて微量であり、抗体クローンの粒子結合実験に利用するにはその産生効率を大幅に上

昇させなければならない。そこで次に、構造蛋白領域に加えその C 末端側に存在する p7、NS2 及びセリンプロテアーゼ活性を有する NS3 を含んだ領域 (1652 アミノ酸)、さらにその一部 (N 末端側あるいは C 末端側) を欠失させたものをそれぞれトランスファーベクターに組み込み、Sf9 細胞に導入し相同組換えによりバキュロウイルスを作製した。得られた組換えウイルスからの HCV 構造蛋白及び NS3 蛋白の発現はウエスタンブロット法で確認した。同様にして、NS3 プロテアーゼ領域のみを発現するバキュロウイルスも調製した。今後、これらの組換えウイルスを組み合わせて細胞に共感染させ、細胞内で発現した NS3 プロテアーゼが構造蛋白をプロセスさせることによって、効率よく構造蛋白が成熟化し VLP が細胞内からまたは (願わくば) 細胞外に放出されたものが培養液中から十分回収できるかを検討していく。

#### D. 結語

1. HCV エンベロープ蛋白に対する結合活性を有する抗体クローンの二次評価系として HCV 粒子に対する結合能を検討した。
2. HCV の構造蛋白及び NS3 プロテアーゼ領域を発現する種々の組換えバキュロウイルスを作製し、これらのウイルスの混合感染による HCV 蛋白及び VLP の産生を検討したが、効率の良い産生は認められなかった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. *Virology*, 254,

315-323, 1999.

Aizaki, H. Aoki Y., Harada T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Cloning of a full length cDNA of hepatitis C virus from an infectious blood sample. *Hepatology*, 27, 621-627, 1998.

松浦善治、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、C 型肝炎ウイルスワクチンの開発、カレントセラピー、16, 2077-2082, 1998.

##### 2. 学会発表

Shoji I., Sato M., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Further cleavage of HCV NS3 protein. 5th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June 24-28, 1998, Venice, Italy.

Tani H., Ishii K., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Apoptosis induced by transiently expressed HCV proteins. 同上.

下池貴志、相崎英樹、谷 英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男：HCV コア蛋白質による HCV RNA の特異的翻訳阻害、第 45 回日本ウイルス学会、1998 年 10 月、東京。

田村幸太郎、石井孝司、鈴木哲朗、真鍋 昇、宮本 元、松浦善治、宮村達男：C 型肝炎ウイルスコア蛋白とエンベロープ蛋白の相互作用、第 21 回日本分子生物学会年会、1998 年 12 月、横浜。

田中義信、石井孝司、下池貴志、鈴木哲朗、牛島廣治、松浦善治、宮村達男：C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質と合成オリゴヌクレオチドとの相互作用、同上。

下池貴志、相崎英樹、谷 英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男：HCV コア蛋白質による HCV RNA の特異的翻訳阻害、同上。

## 分担研究報告書

### 人工免疫グロブリン等の開発に関する研究

分担研究者 井原征治 東海大学医学部分子生命科学2 助教授

#### 研究要旨

ヒト B 細胞に EBV を感染して細胞を不死化する方法を用いて、2 種類のヒト抗体遺伝子のクローニングに成功した。一つはヒトサイトメガロウイルス (HCMV) を中和する抗体であり、2 番目は B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs) を認識する抗体である。前者はオリゴクローンになった状態から RT-PCR により抗体の (H鎖 x L鎖) のライブラリーを作成し、ファージディスプレイ法により抗原に対してパニングをかけて分離したものである。大腸菌で発現したこの Fab 抗体は HCMV を効率よく中和した。また、後者はモノクローンまで継代した状態から抗体遺伝子をクローニングしたが、HBs に対する親和性は高く、抗体 1ng でも親和性が検出できた。これらの経験をもとに、慢性 HCV から自然治癒したと思われる患者の血液を材料に、抗 E2 ヒト抗体遺伝子のクローニングを進めている。

#### A. 研究目的

抗体は血清中あるいは粘膜上皮に高濃度で分泌されるが、抗原に特異的に結合する特性を持つことから、生物医薬として病気の治療に用いる試みが広く検討されている。1986 年に初めて治療用抗体が認可されて以来、現在まで治療用あるいは検査用として認可を受けた抗体は世界で約 20 種にのぼるが、さらに、フェーズ I 及び II 臨床試験の段階で分析されている抗体はこの数を遙かに上回る。これらの抗体は現状では murine 抗体およびヒト・異種動物のハイブリッド抗体（キメラ抗体及びヒト化抗体）である。これらの抗体は治療医薬として有効であるが、抗体の投与を受けた患者に異種動物のアミノ酸配列に対する抗体が作られるため、繰り返しの使用はできない。繰り返しの使用には純粋なヒト抗体を作る必要がある。そのヒト抗体を作製する技術がいくつか開発されているが、その一つが我々が取り組んだファージディスプレイ法である。感染症に罹患した患者の中には、病原体に対し強い親和性を持つ中和抗体が作られることがあるが、ファージディスプレイ法はこの抗体遺伝子を患者 B 細胞から分離し、ヒト抗体を大腸菌で発現させる技術である。病原体に強い親和・中和活性を持つヒト抗体が大量に供給されれば、医療にとって福音となろう。

近年広く実施されている臓器移植医療では、移植成立のため免疫抑制剤の投与が不可欠であるが、免疫能の低下にとれない種々の日和見感染症が発

症する。そのうち特にヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染症は、頻度・重症度ともに高く、致命的な経過をたどることが多いため、その阻止が大きな課題である。B 型肝炎ウイルス感染症はワクチンの普及によって日本ではほぼ制圧されたが、中国を含む東南アジア地域では猛威を振るっており、特に母児垂直感染の阻止は重要課題である。これを防ぐために、新生児に対してワクチンと免疫グロブリン製剤の同時投与が効果的である。また、C型肝炎ウイルス (HCV) は感染すると高率で慢性化し、ときに重症化する。これらの感染症に対し有効な防御・治療法の確立は急務である。そこで、新しい発想に立つ治療法として抗ウイルス中和ヒト抗体の利用を考えた。

本研究は、ヒト抗体作製技術を駆使して、HCMV、HBV さらには HCV を中和するヒト抗体の遺伝子をファージディスプレイ法を用いて単離すること、そしてこの遺伝子の発現を大腸菌でおこなない抗体蛋白質を安価に作製する方法を確立し、ウイルス感染の治療に使用することを目的とする。

#### B. 研究方法

目的抗体遺伝子をより効率的にクローニングするために、B 細胞に EBV を感染し不死化細胞を樹立する方法を用いた。HCMV 陽性者 B 細胞の場合は EBV 感染後 3 週間培養し、オリゴクローン状態の抗体産生細胞から抗体ライブラリーを作製し、パニングにより中和抗体をスクリーニングした。

HBV の場合は、EBV 感染後長期間培養し、抗 HBs 抗体産生モノクローン細胞 (CL4) の樹立に成功している。方法は、以下の手順を踏む。

1. 抗体陽性者の末梢血より B リンパ細胞を分画し、EBV を感染する。 $10^4 \sim 10^5$  細胞を 96 穴プレートにまき培養を続け、培養上清に目的抗体を分泌している穴を探す。陽性細胞群から RNA を抽出して RT-PCR で抗体ライブラリーを作成する。この方法では、抗体産生陽性の細胞群のみを対象にすること、また計算上はライブラリーサイズは小さくなるため、クローニング効率は良くなると考えられる。
2. 増幅した L 鎖と H 鎖 Fd の DNA 断片を発現ベクター pRPLS/Fab-I にクローニングする。抗体分子は M13 ファージの第 III 遺伝子産物と融合したかたちでファージ粒子面に発現するように設計してある。DNA 断片を結合した pRPLS/Fab-I は大腸菌に導入し、ヘルパー M13 ファージを感染し、抗体分子を発現した M13 ファージを回収する。
3. パニング及び ELISA に用いる抗原を調整する。HCMV の場合は感染細胞抽出液を用いた。HBV の場合は HBs 産生肝ガン細胞より HBs を精製した。
4. 抗原に、抗体を発現している M13 ファージを反応させる。このとき抗原-抗体反応で、目的抗体を発現しているファージは結合する。未反応ファージを洗い流し、結合しているファージを回収し 2 次選択に使用する。3 回の選択を繰り返し、目的抗体を発現しているファージを濃縮する。
5. 最終の選択で残ったファージの各クローンをさらにスクリーニングをかける。

## C. 研究結果

### 1. HCMV 中和抗体

最終パニングで残った各クローンを、HCMV 抗原を用いた ELISA でスクリーニングをおこなった結果、6 クローンが反応した。このうちの 1 株、Cl.13-3、は特に強く反応した。Cl.13-3 は蛍光抗体法で非感染 HEL 細胞には反応しないが HCMV 感染細胞には反応した。また、感染初期には反応が見られず、感染後期細胞と反応すること、その他から Cl.13-3 は感染後期の蛋白質を認識することが判明した。しかし、免疫沈殿や Western blot 分析で特異蛋白を同定することはできなかった。さらに、Cl.13-3 は HCMV Towne 株のみならず AD169 株も中和することから、スペクトルは広いことが判明した。また Cl.13-3 は  $1 \text{ m g/m l}$  でウ

イルスの感染価を半減させる能力を持っていた。

### 2. 抗 HBs 抗体

CL4 細胞は抗 HBs 抗体陽性者 B 細胞に EBV を感染し、長期間培養を続けた結果得られた HBs 抗原と強く反応するモノクローン抗体産生株である。この株より RNA を抽出し、RT-PCR によって  $\gamma$  鎖および  $\kappa$  鎖の Fab 領域を増幅した。PCR 産物は pFab-His2 ベクターにクローニングした。これを大腸菌にトランスフォームし、生じたコロニーについて培養をおこない IPTG 誘導後、菌体破碎液の上清を Fab 抗体試料とし分析した。この結果抗 HBsFab 抗体 CL4-3 が分離できた。この株の特性は、i) CL4-3 は HBs を産生している Alexander cell に反応した。ii) CL4-3 は Fab 抗体であるが、HBs に対する親和性は親株 CL4 の whole 抗体と同程度の活性を示す。iii) 現在治療に使われている抗 HBs 免疫グロブリン製剤と FabCL4-3 を ELISA で活性比較をおこなった結果、グロブリン製剤の 1 units に Fab 抗体 CL4-3 の 20ng が相当した。親株の CL4 では EBV が感染しているため、抗体を精製しても治療への使用は不許可となるが、今回得られた結果が示すように、FabCL4-3 は EBV は free であり、少量で高い活性を示すことから、今後、人の HBV 感染症治療への使用が期待できる。現在日本の企業 2 社と中国政府機関とで工業化と中国での使用が検討されている。

### 3. 抗 HCV 抗体

慢性 HCV 感染患者でまれに自然治癒する例がある。このような患者では多くの場合 NOB 抗体陽性である事が発見され、conformational な E2 を認識する抗体が産生された場合、病気が治癒に向く可能性が考えられている。そこで、HCV が自然治癒し NOB 抗体陽性患者の B 細胞に上記 (1, 2) の研究方法を適用し、NOB 関連抗体遺伝子の分離をめざした。しかし、NOB 陽性患者の B 細胞に EBV を感染させる実験を繰り返しおこなったが、不死化細胞わずかしか生ぜず、しかもこれらの細胞には NOB 活性は検出できなかった。EBV 感染で不死化細胞が樹立できない事は希に生ずるが、主治医に問い合わせたところ、同患者は継続的に免疫抑制剤が投与されていることが判明した。我々の経験から、免疫抑制剤は T 細胞のみならず B 細胞にも影響すると考えられ、不死化細胞が樹立できなかった原因がここにある可能性がある。なお同患者の血液材料から、抗体ライブラリーは作製してある。今後、精製 E2 抗原を用いてファージディスプレイ法により NOB 関連抗体遺伝子の分離をめ

ざす。

#### D. 考察

抗体遺伝子のクローニングで我々が直面している大きな問題点は、日本では血液が少量しか利用できないことにある。欧米では、10Lの血液から成分分離器でB細胞を精製したり、2Lの血液からRNAを調製した例が報告されているが、この規模のB細胞からは精製 mRNA が大量に得られ、大きなサイズの抗体ライブラリーが作製されている。しかし我々の環境では、抗体価の高い患者が見つかって、最大で30mlの血液しか得られず、ほとんどの場合は10ml以下であった。

本研究では、EBV感染とファージディスプレイ法を組み合わせた、少量の血液でもこの方法はヒト抗体遺伝子のクローニングに有効であることが判明した。

#### E. 結論

ファージディスプレイ法を構築し、医療用ヒト抗体作製を目指して研究を行ってきた。現在までに、HCMV中和抗体、HBs抗体のヒト抗体の分離に成功したが、HCV NOB 関連抗体は得られなかった。しかし、問題点は一つ一つ解決している。今後も、臨床で使用できる強い中和活性を持つヒトモノクローナル抗体の作製を目的とした努力を続けてゆく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takekoshi M., Maeda F., Tachibana H., Inoko H., Kato S., Takakura I., Kenjyo T., Hiraga S., Ogawa Y., Horiki T., and Ihara S., Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J. Virol. Methods*, 74, 89-98, 1998.

Tachibana H., Takekoshi M., Cheng X-J., Maeda F., Aotsuka S., and Ihara S., Bacterial expression of a neutralizing mouse monoclonal antibody Fab fragment to a 150-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 35-40, 1999.

Tachibana H., Cheng X-J., Watanabe K., Takekoshi M., Maeda F., Aotsuka S., Kaneda Y., and Ihara S.,

Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, in press.

Maeda F., Nagatsuka Y., Ihara S., Aotsuka S., Ono Y., Inoko H., and Takekoshi M., Bacterial expression of recombinant human monoclonal antibody Fab fragment to hepatitis B surface antigen. *J. Med. Virol.*, in press.

井原征治、前田史子、竹腰正隆、大腸菌発現系でのヒト抗サイトメガロウイルス中和抗体の作製、*日本臨床*、56巻、161-166, 1998.

##### 2. 学会発表

竹腰正隆、安達暁子、増井 理、前田史子、井原征治、ヒトサイトメガロウイルスに対する組換えヒト中和抗体の作製、第13回ヘルペスウイルス研究会、1998.

前田史子、竹腰正隆、長塚靖子、小野 魁、井原征治、ヒト抗HBsモノクローナル抗体カクテル調整の試み、第46回日本ウイルス学会総会、1998.

前田史子、竹腰正隆、長塚靖子、小野 魁、井原征治、オリゴクローンよりの抗HBsヒトモノクローナル抗体の調整、第21回日本分子生物学会年会、1998.

竹腰正隆、前田史子、長塚靖子、小野 魁、井原征治、オリゴクローン法による抗TNF- $\alpha$ ヒトモノクローナル抗体の作製、同上。

長塚靖子、竹腰正隆、前田史子、井原征治、小野 魁、交差反応性により新しい9-O-アセチル化ガングリオシドを認識するヒト抗i 単クローン抗体GL-2の大腸菌発現系への転換、第8回日本免疫学会総会、1998.

橘 裕司、程 訓佳、渡辺勝臣、金田良雅、竹腰正隆、前田史子、井原征治、赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌による作製、第67回日本寄生虫学会、1998.

Tachibana H., Cheng X-J., Watanabe K., Kaneda Y., Takekoshi M., Maeda F., Ihara S., Bacterial expression of human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*, 47 *th Parasitology International*, 1998.



