

厚生省

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

平成11年度 総括研究報告書

松浦 善治

国立感染症研究所 ウイルス第二部

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
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 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、未だ有効な治療のないC型肝炎対策に応用することを目的として研究を遂行した。精製したHCVのエンベロープ蛋白が細胞へ結合するのを阻止する抗体（NOB 抗体）が陽性で、慢性C型肝炎から自然に治癒した症例から末梢リンパ球を採取してヒト型抗体の選別を試み、活性を示す単鎖抗体を得た。しかしながら、この様なNOB 抗体はエンベロープ蛋白とヒトCD81 との結合を阻止するもので、それ以降の感染プロセスの解析はできない。そこで、HCV が細胞に吸着後、エンベロープ蛋白と細胞膜が融合し、ウイルス遺伝子が細胞質内へ侵入するステップを阻害できる抗体をスクリーニングするため、細胞融合アッセイ系とHCV のエンベロープ蛋白を粒子表面に被った偽ウイルス粒子を作製し、HCV のエンベロープ蛋白による侵入機構を解析した。その結果、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合・侵入にはE1とE2 蛋白の両者が必要であり、ヒトCD81 の発現は必ずしも必要なかった。両アッセイで最も高い感受性を示したヒト肝癌由来細胞の細胞膜表面分子の解析から、HCV のリセプターは蛋白分子であり、さらに細胞表面の硫酸多糖類が感染に重要な役割を演じていることが示された。また、自然治癒した症例から中和抗体の遺伝子を分離するだけでなく、ヒト抗体を作るトランスジェニックマウス（ゼノマウス）をHCV のエンベロープ蛋白で免疫し、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和できるヒト型抗体を得た。

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  
井原征治 東海大学医学部分子生命科学  
助教授

A. 研究目的

HCV は輸血後感染症の最も大きな問題であったが、高感度抗体検出系の開発によりその感染者は激減した。しかしながら、我が国には二百万人以上ものHCV のキャリアが存在すると推定され、HCV 感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。HCV を増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでに慢性C型肝炎からの自然治癒例にHCV の二つのエンベロープ蛋白（E1 とE2）のうちのE2 蛋白が細胞表面のCD81 分子に結合するのを阻止できる抗体（

NOB 抗体）が高率に出現することを見出した。この成績を基にしてファージディスプレイ法を用いてNOB 活性を示す一本鎖ヒト抗体の作製を試みた。また、HCV の細胞へ吸着以降のステップ（細胞融合とウイルス核酸の侵入）を解析できる系を構築し、さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免疫し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得することを目的とした。

B. 研究方法

(i) 抗体ライブラリーの作製とスクリーニング

高い結合阻止抗体価を示し、慢性C型肝炎から自然治癒された方にインフォームドコンセントを得て末梢リンパ球を採取し、ファージディスプレイ系を用いて、組換え抗体のライブラリーを作製した。その中から結合阻止活性を指標にして高い活性を示すものを選別した。

(ii) 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

一方の細胞に HCV にエンベロープ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、もう一方の細胞にはリポーターとして 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、両者を混合培養する。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。この系を利用して HCV エンベロープ蛋白のリセプターの検索を行う。また、得られた組換え抗体の細胞融合阻止活性を調べた。

### (iii) シュードタイプウイルスの作製

VSV の粒子表面に本来のエンベロープ蛋白の代わりに、HCV の組換えエンベロープ蛋白を被ったシュードタイプウイルスを作製し、組換え抗体の感染防御活性を調べた。

### (倫理面への配慮)

一人の慢性 C 型肝炎から自然治癒された方に、本研究の趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

### 1) NOB 活性を持ったヒト型抗体の作製

高い NOB 抗体価を持ち、慢性 C 型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取してヒト型抗体の選別を試みた。現在得られたクローンの性状を調べている。

### 2) HCV エンベロープ蛋白の細胞融合および侵入機構の解析

HCV が細胞に吸着後、エンベロープ蛋白と細胞膜が融合し、ウイルス遺伝子が細胞質内へ侵入するステップを阻害できる抗体をスクリーニングするため、以下の二つのアッセイ系を構築した。まず、HCV のエンベロープ蛋白を細胞表面に発現する細胞株を樹立し、この細胞株に T7 RNA ポリメラーゼを発現させ、予め T7 プロモーターの下流にリポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを導入したターゲット細胞と混合培養し、リポーター遺伝子活性化を指標にして、HCV エンベロープ蛋白の細胞融合活性を定量的にアッセイした。また、HCV のエンベロープ蛋白を粒子表面に被った組換え水痘性口内炎ウイルス (VSV) を作製し、HCV のエンベロー

プ蛋白による侵入機構を解析した。その結果、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合・侵入には E1 と E2 蛋白の両者が必要であり、ヒト CD81 の発現は必ずしも必要なかった。このことは、E2 蛋白の結合にはヒト CD81 が必須であるが、それ以降の細胞融合や侵入には他の分子が必要なのか、NOB アッセイで使用している精製 E2 蛋白と細胞膜表面に発現させた E2 蛋白の構造がかなり違っているためなのか、あるいは、ヒト CD81 非依存的な感染機構が存在することを示しているのかも知れない。両アッセイで最も高い感受性を示したヒト肝癌由来細胞の細胞膜表面分子の解析から、HCV のリセプターは蛋白分子であり、さらに細胞表面の硫酸多糖類が感染に重要な役割を演じていることが示された。

### 3) ヒト抗体遺伝子を持ったトランスジェニックマウスを用いた抗 HCV 抗体の作製

ヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞膜成分を抗原として免疫し、中和活性を保持した HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の作製を試みた。その結果、E1 に対する抗体が 6 種、E2 に対する抗体が 3 種得られた。いずれの抗体も NOB 活性およびシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったが、いくつかの抗体は HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

## D. 考察

高い NOB 抗体価を持った慢性 C 型肝炎からの自然治癒例のリンパ球からファージディスプレイ法を用いて NOB 活性を示す一本鎖ヒト抗体を得た。今後、これらの一本鎖ヒト抗体を完全なヒト型抗体に再構築し、より強い NOB 活性をもったヒト抗体の作製が必要と思われる。また、NOB 抗体では解析できない、HCV の細胞へ吸着以降の細胞融合やウイルス核酸の侵入のステップを解析できる系を構築できたことは、HCV の感染機構の解明、特にリセプターの同定に極めて重要な進展であると思われる。さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免疫し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得した。今後、これまでに得られたヒト型抗体の生体からのウイルス排除活

性を、HCV に持続感染しているチンパンジーを用いて検討することが重要と思われる。

#### E. 結論

1) 慢性C型肝炎から自然治癒し、かつ高いNOB抗体価を持ったヒトの末梢リンパ球から組換え抗体のライブラリーを作製し、NOB活性を示す一本鎖抗体2クローンを得た。2) 高感度な細胞融合アッセイ系とHCVの組換えエンベロープ蛋白を被ったシュードタイプウイルスを作製し、CD81非依存的な感染機構が存在することが明らかにした。3) ヒトのイムノグロブリン遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスをHCVのエンベロープ蛋白で免役し、HCVのエンベロープ蛋白を認識するヒト型抗体10クローンを得た。これらの抗体は結合阻止活性やシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったものの、HCVのエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kamei A., Tamaki S., Taniyama H., Takamura S., Nishimura Y., Kagawa Y., Uno-Furuta S., Kaito M., Kim G., Toda M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology*, (印刷中)
- 2) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Asakura H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 5066-5074 (2000).
- 3) Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *Virology*, 270, 229-236 (2000).
- 4) Tatsuo H., Okuma K., Tanaka K., Ono N., Minagawa H., Takeda A., Matsuura Y., and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of

Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 4139-4145 (2000).

- 5) Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, 42, 145-152 (1999).
- 6) Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30, 1064-1076 (1999).
- 7) Shimoike T., Mimori S., Tani H., Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. *J. Virol.*, 73, 9718-9725 (1999).
- 8) Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- $\alpha$  promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Vaccine*, 18, 675-680 (1999).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Tachibana H., Cheng X., 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.* 6, 383-387(1999).
  - 13) 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.* 58, 338-345(1999).
2. 学会発表
- 1) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Abrignari S., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of HCV envelope proteins. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June, 1999, Bethesda, USA.
  - 2) Tamura K., Ishi K., Suzuki R., Manabe N., Miyamoto H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein and envelope proteins. *iblid*.
  - 3) Matsuura Y., Tani H., Suzuki R., Ishii K., Houghton M., Abrignari S., Whitt M., and Miyamura T. Infection mechanism of the pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *iblid*.
  - 4) Tani H., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y., Efficient gene expression in mammalian cells by novel baculoviruse vectors, XIth International Congress of Virology, August, 1999, Sydney.
  - 5) Matsuura Y., Ishii K., Takikawa S., Tamura K., Tani H., Suzuki R., Suzuki T., Houghton M., Abrignari S., Whitt M., and Miyamura T. Characterization of hepatitis C virus envelope proteins. *iblid*.
  - 6) 人工免疫グロブリンの開発, 竹腰正隆、安達暁子、増井 理、前田史子、井原征治. 第 14 回ヘルペスウイルス研究会、ワークショップ (1999)
  - 7) HCMVを中和する組み換えヒトモノクローナル抗体の作製, 井原征治、前田史子、腰正隆. 第 47 回日本ウイルス学会 (1999)
  - 8) ファージディスプレイ法によるHCMV中和人工ヒト抗体の作製, 安達暁子、前田史子、竹腰正隆、井原征治. 第 22 回日本分子生物学会年会 (1999)
  - 9) HLA タイピングに使用する組み換えヒト抗体の作製 増井 理、竹腰正隆、前田史子、安藤 等、成瀬妙子、猪子英俊、井原征治. 第 22 回日本分子生物学会年会 (1999)
  - 10) Preparation of a human monoclonal antibody Fab fragment recognizing a surface antigen of *Entamoeba Histolytica*. Hiroshi Tachibana, Xun-Jia Cheng, Yoshimasa Kaneda, and Seiji Ihara. 第 68 回日本寄生虫学会 (1999)
- G. 知的所有権の取得状況  
特になし。

厚生省

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

平成11年度 分担研究報告書

松浦 善治

国立感染症研究所 ウイルス第二部

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
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 助教授

研究要旨

ヒトリンパ球に EBV を感染させ、

- (1) 特定抗体産生の不死化細胞を樹立する（抗 HBs 抗体に適用）
- (2) EBV 感染後にマウス骨髄腫細胞と融合しハイブリドーマ細胞を作製し、特定抗体産生細胞を分離する（抗 HLA 抗体に適用）
- (3) 感染後早い時期に抗体ライブラリーを作製し、パニングにより特定抗体遺伝子を分離する（抗 HCV 抗体に適用）

などの方法により抗体遺伝子の分離を試みた。その結果、(1)の抗 HBs 抗体に関しては前年度に報告したクローン CL-4 以外に、異なるエピトープを認識する 2 種の抗体遺伝子の分離に成功した。また、これらに関しては、明治乳業ヘルスサイエンス研との共同作業で、工業化の研究が発足した。(2)の抗 HLA 抗体に関しては、B51 抗原を認識し、細胞毒性テストで陽性反応を示す抗体を分泌する細胞から抗体遺伝子を分離した。また、(3)の抗 HCV 抗体に関しては、精製 E2 抗原を使用してパニングを行ったが目的クローンが濃縮されず、成功にはいたらなかった。また、EBV を感染しないで B 細胞から抗体ライブラリーを作製し、そこから直接スクリーニングする方法（抗赤痢アメンバー抗体に適用）も行った。

A. 研究目的

我が国で開発され発売の認可を受けた治療用モノクローン抗体は、1991 年の「オルソクローン OKT-3」だけであるが、アメリカでは 1998 年に治療用抗体が続々と実用化され、1999 年にはヨーロッパでキメラ抗体、ヒト化抗体の実用化が一気に拡大した。さらに、現在フェーズ I~III で臨床試験が行われている治療用抗体は全世界で 100 種を越えるが、その内容は (1) 抗血栓剤、(2) 抗ガン剤、(3) 感染症治療薬、(4) 免疫抑制剤、(5) 自己免疫疾患治療薬 (6) 抗炎症剤、など多岐にわたる。この様な爆発的な広がりを見せた理由は、既に実用化されている人工抗体の治療効果が非常に優れていること、また、人工抗体と既存の薬剤との併用で治療効果が向上する例が認められる例があり、これは抗体が薬剤とは異なる機構で作用していることを示すものであり、この点も、開発に拍車がかかる理由になっている。現状で認可を受けている治療用抗体は、マウスモノクローナル抗体およびヒト・異種動物からなるキメラ抗体及びヒト化抗体である。異種動物の配列を含まない完全なヒト抗体は、次世代の治療用

抗体という立場にあるが、現在、数種類について臨床試験が行われる段階に至っている。ヒト抗体作製法はいくつか考案されているが、その一つがファージディスプレイ法である。特定の抗原に対する抗体を有する人は、B 細胞の中にこの抗体を発現・分泌しているものがあるわけであるが、この抗体遺伝子を分離し、大腸菌でヒト抗体を発現させる技術が同法の原理である。我々は病原体の増殖を強力に阻害する中和抗体および、HLA タイピングに必要な抗 HLA 抗体遺伝子の分離と抗体作製にファージディスプレイ法を適用した。

B. 研究方法

方法は、以下の手順を踏む。

第一には、B細胞に EBV を感染し、抗体産生陽性の細胞群から抗体遺伝子を分離する試みである。この方法では、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。EBV 感染後は (1) 特定抗体を産生する不死化細胞の樹立、(2) ヘテロハイブリドーマの作製、(3) 抗体陽性の細胞群から抗体ライブラリーを作製し、パニングによって目的抗体遺

伝子の濃縮をする、の3つの異なる方法で目的抗体遺伝子の分離を行った。また、第二には、EBVを感染しない方法で、(4) B細胞から直接抗体ライブラリーを作製し、パニングをしないでライブラリーの中から総当たりに目的抗体をスクリーニングすることも行った。

実験手順は以下の通りである。

(E) 細胞からRNAを抽出して RT-PCR で抗体ライブラリーを作成する。

(F) 増幅した L鎖と H鎖 Fd の DNA 断片を発現ベクター pFabI-His2 [上記の(1)、(2)、(4)で使用] または pRPLS/Fab-I [上記(3)で使用] にライゲーションし大腸菌に導入する。

(G) pRPLS/Fab-I に DNA 断片を結合した場合は、DNA を大腸菌に導入後ヘルパー 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。精製した組み換え HCV E2 抗原に、抗体を発現している M13 ファージを反応させパニングを行う。この過程では抗原-抗体反応により、抗 E2 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回の選択を繰り返すことで、抗 E2 抗体を発現しているファージを濃縮する。

(H) pFabI-His2 に DNA 断片を結合したクローン、およびパニングを行った pRPLS/Fab-I 由来のクローン DNA を大腸菌に導入し、各クローンが産生する抗体の抗原特異性を ELISA で調べ、スクリーニングをかける。

## C. 研究結果

### a. 抗 HBs 抗体

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、HBs 抗原と強く反応するオリゴクローン抗体産生株が数株得られた。そのうちの1株から前年度に報告したクローン CL4-3 を分離したが、今年度はさらに異なる細胞株から抗体遺伝子を分離し、そのうち、オリゴクローン 303 と 305 から HBs 抗原と親和活性の高いクローンが得られた。遺伝子解析の結果、いずれも H鎖は $\gamma$ 鎖のみで、すべて IgG1, VH3 ファミリーに属し、フレームワークと定常領域はほぼ同一の配列を示したが、一方で CDR はかなりの相違があった。L鎖に関しては $\kappa$ 鎖が多く見られ、303 と 305 由来の Fab 抗体は共に抗 HBs 活性を示した。305 はリニアエピトープを認識するクローンであるが、クローン 303 はコンフォメーションな

エピトープを認識し、その領域は 305 や CL4-3 とは距離的に離れた領域を認識することが判明した。抗体のアフィニティに関しては最も高い解離定数を示すものが  $10^{-7}$  程度であった。現在さらに別のクローンについても解析中である。親株では EBV が感染しているため、抗体を精製しても人の疾患の治療で使用することは不許可であるが、Fab 抗体は 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許可が期待できる。現在明治乳業で工業化の研究を開始したが、大量生産体制が整えば中国政府機関との共同研究を行い、中国での使用を検討する。

### b. 抗 HLA 抗体

HLA の B51 抗原に対する抗体 (抗 B51 抗体) 陽性者の末梢血 400ml からB細胞を分離し、EBV を感染した。各  $5 \times 10^4$  細胞を 96 穴プレート 50 枚にまき、細胞が増殖した段階で培養上清の細胞毒性テストをおこなった。陽性を示す穴の細胞を集め、マウスミエローマ細胞と融合しヘテロハイブリドーマ細胞を作製した。この方法で得た JRH04 細胞はヒト IgM/ $\kappa$  を産生するモノクローン抗体産生株であるが、この株の産生する抗体は FACS 解析で B51 リンパ球に特異的に反応し、また高い細胞毒性活性を示した。そこで、この細胞から RT-PCR 法で抗体遺伝子を増幅し、pFabI-His2 にクローニングした。得られた Fab クローンは、FACS 解析で B51 リンパ球にわずかではあるが反応する結果を得た。それ以外の解析を現在行っている。

### c. 抗 HCV E2 抗体

HCV 患者の中で非常にまれであるが肝機能が正常化し、自然治癒したと思われる例があるが、この患者から発見されたコンフォメーションなエピトープ E2 と結合する抗体 (NOB: Neutralization of Binding) の関連遺伝子の分離をめざした。NOB 陽性患者の B 細胞に EBV を感染させ培養上清中の抗 E2 抗体価を測定した。この陽性を示す穴の細胞の培養を継続し、株細胞の樹立を目指したが、抗体の産生は短時間しか続かず、すぐ抗体を産生しなくなり、目的は成功しなかった。そこで、患者 B 細胞から抗体ライブラリーを作製し、組み換え E2 を抗原にしてパニングをおこない、抗 E2 抗体遺伝子の分離を行った。しかし、約 1500 クローンをスクリーニングしたが E2 抗原と反応するクローンは得られなかった。

### d. 抗赤痢アメーバ抗体



赤痢アメーバ感染に関し healthy-carrier の中で抗赤痢アメーバ抗体価が高値の患者血液から、IgG/ $\kappa$  の抗体ライブラリーを作製した。この場合は PCR を行って得た  $\gamma$  鎖 Fd 断片および  $\kappa$  鎖を pFab-His2 ベクターにクローニングし、パニング過程は省略して直接スクリーニング過程に入る方法で、目的抗体の分離を行った。スクリーニング法は、固定した虫体を抗原にした蛍光抗体法であるが、約 4000 クローンについて分析をした結果、虫体の外膜に強く反応する 1 クローンが分離できた。この抗体は、赤痢アメーバのうち病原性のある株には反応するが、非病原性の株には反応しないこと、また、Western ブロット分析では 260Kd の糖蛋白質を特異的に認識することが判明した。しかし、期待した赤痢アメーバの感染を阻害する効果は見られなかった。

#### D. 考察

欧米各国で治療用人工抗体が続々と実用化され始めている。この状況下で、次世代の抗体となるヒト抗体の作製に取り組むのは有意義である。今年度は、主に B 細胞に EBV を感染して不死化させ、抗体産生を確認した後に細胞抗体遺伝子をクローニングする方法を用いたが、この方法により、いくつかの抗体遺伝子を分離した。しかし、ファージディスプレイは抗原-抗体反応を利用したパニングにより選択的に目的抗体クローンを濃縮し、その後のスクリーニングにより抗体遺伝子を分離することを原理とする。しかしながら、実際には非特異的な反応が高率で起きるため、現状では成功する例がくどの研究グループもこの問題の解決に苦心している。我々も、今年度は HCV 抗 E2 抗体の分離には、精製組み換え E2 抗原を使用してパニングを行った。また、他の抗体の分離でもエピトープ部分のオリゴペプチドを使用した例があるが、いずれの試みも抗体ライブラリーから特定抗体遺伝子の分離に成功せず、今後課題を残している。赤痢アメーバの場合は、病原性株に特異的に反応するクローンを 1 株を分離することができた。この場合は、抗赤痢アメーバ抗体価が非常に高い血液から抗体ライブラリーを作製したが、パニングをすることなくスクリーニングを行ったにも関わらず有用な抗体が分離できたことから、抗体価が非常に高い血液材料を使うことが、成功の重要な要素になるのかもしれない。大腸菌の skp 遺伝子が、ファージディスプレイで抗体産物の発現量を増大し、かつ、産物の安定性を促進す

るという報告がある。そこで、我々もこの skp 遺伝子を組み込んだ pRPLS/Fab-I および pFabI-His2 発現ベクターを構築した。今後、これらのベクターに抗体遺伝子をクローニングし、パニングの成績を検討していく。

#### E. 結論

ファージディスプレイ法を構築し、治療用ヒト抗体作製を目指して研究を行ってきた。抗 HBs 抗体で新たに 2 クローンの分離に成功した。これらは、昨年報告した CL4-3 とは認識エピトープが異なる。抗 HBs 抗体の工業化の検討が我々と明治乳業細胞工学センターとの共同で開始している。また、赤痢アメーバ病原性株の 260Kd の糖蛋白質を特異的に認識する抗体遺伝子の分離に成功した。これらに反して、HCV E2 関連抗体は得られなかった。成功しなかった原因はパニングで非特異的な反応が高頻度で起きてしまうことである。今後、この点の改良が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tachibana H., Cheng X., 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. 6, 383-387 (1999).
- 2) 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. 58, 338-345 (1999).

##### 2. 学会発表

- 1) 人工免疫グロブリンの開発。竹腰正隆、安達暁子、増井理、前田史子、井原征治。第 14 回ヘルペスウイルス研究会、ワークショップ (1999)。
- 2) HCMV を中和する組み換えヒトモノクローナル抗体の作製。井原征治、前田史子、腰正隆。第 47 回日本ウイルス学会 (1999)。
- 3) ファージディスプレイ法による HCMV 中和人工ヒト抗体の作製。安達暁子、前田史子、竹腰正隆、井原征治。第 22 回日本分子生物学

会年会（1999）。

- 4) HLA タイピングに使用する組み換えヒト抗体の作製。増井 理、竹腰正隆、前田史子、安藤 等、成瀬妙子、猪子英俊、井原征治。第22回日本分子生物学会年会（1999）。
- 5) Preparation of a human monoclonal antibody Fab fragment recognizing a surface antigen of Entamoeba Histolytica. Hiroshi Tachibana, Xun-Jia Cheng, Yoshimasa Kaneda, and Seiji Ihara. 第68回日本寄生虫学会（1999）

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
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 主任研究官

**研究要旨** 慢性C型肝炎から自然に治癒した症例に、C型肝炎ウイルス（HCV）のエンベロープ蛋白が細胞表面のCD81分子に結合するのを阻止できる抗体（結合阻止抗体、NOB抗体）が高率に出現することが知られている。そこで、慢性C型肝炎の自然治癒例の末梢リンパ球のライブラリーよりNOB活性を示す一本鎖抗体を得た。また、ヒトの抗体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、HCVのエンベロープ蛋白による細胞融合を中和するヒト型抗体を得た。

A. 研究目的

HCVは輸血後感染症の最も大きな問題であったが、高感度抗体検出系の開発によりその感染者は激減した。しかしながら、我が国には二百万人以上ものHCVのキャリアーが存在すると推定され、HCV感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。HCVを増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでに慢性C型肝炎からの自然治癒例にHCVの二つのエンベロープ蛋白（E1とE2）のうちのE2蛋白が細胞表面のCD81分子に結合するのを阻止できる抗体（NOB抗体）が高率に出現することを見出した。この成績を基にしてファージディスプレイ法を用いてNOB活性を示す一本鎖ヒト抗体の作製を試みた。また、HCVの細胞へ吸着以降のステップ（細胞融合とウイルス核酸の侵入）を解析できる系を構築し、さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免疫し、HCVのエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得することを目的とした。

B. 研究方法

(i) 抗体ライブラリーの作製とスクリーニング

高い結合阻止抗体価を示し、慢性C型肝炎から自然治癒された方にインフォームドコンセントを得て、末梢リンパ球を採取し、その中から結合阻止活性を指標にして高い活性を示すものを選別した。

(ii) 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

一方の細胞にHCVにエンベロープ蛋白とT7ポリメラーゼを発現させ、もう一方の細胞にはリポーターとして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、両者を混合培養する。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。この系を利用してHCVエンベロープ蛋白のリセプターの検索を行う。また、得られた組換え抗体の細胞融合阻止活性を調べた。

(iii) シュードタイプウイルスの作製

VSVの粒子表面に本来のエンベロープ蛋白の代わりに、HCVの組換えエンベロープ蛋白を被ったシュードタイプウイルスを作製し、組換え抗体の感染防御活性を調べた。

（倫理面への配慮）

一人の慢性C型肝炎から自然治癒された方に、本研究の趣旨を説明し、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) NOB活性を持ったヒト型抗体の作製

高いNOB抗体価を持ち、慢性C型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取してヒト型抗体の選別を試みた。現在、得られたクローンの性状を調べている。

2) HCVエンベロープ蛋白の細胞融合および侵入機構の解析

HCV が細胞に吸着後、エンベロープ蛋白と細胞膜が融合し、ウイルス遺伝子が細胞質内へ侵入するステップを阻害できる抗体をスクリーニングするため、以下の二つのアッセイ系を構築した。まず、HCV のエンベロープ蛋白を細胞表面に発現する細胞株を樹立し、この細胞株に T7 RNA ポリメラーゼを発現させ、予め T7 プロモーターの下流にリポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを導入したターゲット細胞と混合培養し、リポーター遺伝子活性化を指標にして、HCV エンベロープ蛋白の細胞融合活性を定量的にアッセイした。また、HCV のエンベロープ蛋白を粒子表面に被った組換え水疱性口内炎ウイルス (VSV) を作製し、HCV のエンベロープ蛋白による侵入機構を解析した。その結果、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合・侵入には E1 と E2 蛋白の両者が必要であり、ヒト CD81 の発現は必ずしも必要なかった。このことは、E2 蛋白の結合にはヒト CD81 が必須であるが、それ以降の細胞融合や侵入には他の分子が必要なのか、NOB アッセイで使用している精製 E2 蛋白と細胞膜表面に発現させた E2 蛋白の構造がかなり違っているためなのか、あるいは、ヒト CD81 非依存的な感染機構が存在することを示しているのかも知れない。両アッセイで最も高い感受性を示したヒト肝癌由来細胞の細胞膜表面分子の解析から、HCV のリセプターは蛋白分子であり、さらに細胞表面の硫酸多糖類が感染に重要な役割を演じていることが示された。

3) ヒト抗体遺伝子を持ったトランスジェニックマウスを用いた抗 HCV 抗体の作製

ヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞膜画分を抗原として免疫し、中和活性を保持した HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の作製を試みた。その結果、E1 に対する抗体が 6 種、E2 に対する抗体が 3 種得られた。いずれの抗体も NOB 活性およびシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったが、いくつかの抗体は HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

#### D. 考察

高い NOB 抗体価を持った慢性 C 型肝炎からの自然治癒例のリンパ球からファージディスプレイ法を用いて NOB 活性を示す一本鎖ヒト抗体を得た。今後、これらの一本鎖ヒト抗体を完全なヒト型抗体に再構築し、より強い NOB 活性をもった

ヒト抗体の作製が必要と思われる。また、NOB 抗体では解析できない、HCV の細胞へ吸着以降の細胞融合やウイルス核酸の侵入のステップを解析できる系を構築できたことは、HCV の感染機構の解明、特にリセプターの同定に極めて重要な進展であると思われる。さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免役し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得した。今後、これまでに得られたヒト型抗体の生体からのウイルス排除活性を HCV に持続感染しているチンパンジーを用いて検討することが重要と思われる。

#### E. 結論

1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒し、かつ高い NOB 抗体価を持ったヒトの末梢リンパ球から組換え抗体の cDNA ライブラリーを作製し、NOB 活性を示す一本鎖抗体 2 クローンを得た。2) 高感度な細胞融合アッセイ系と HCV の組換えエンベロープ蛋白を被ったシュードタイプウイルスを作製し、CD81 非依存的な感染機構が存在することが明らかにした。3) ヒトの抗体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白で免役し、HCV のエンベロープ蛋白を認識するヒト型抗体 10 クローンを得た。これらの抗体は結合阻止活性やシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったものの、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kamei A., Tamaki S., Taniyama H., Takamura S., Nishimura Y., Kagawa Y., Uno-Furuta S., Kaito M., Kim G., Toda M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology*, (印刷中)
- 2) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Asakura H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 5066-5074 (2000).
- 3) Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and

Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *Virology*, 270, 229-236 (2000).

- 4) Tatsuo H., Okuma K., Tanaka K., Ono N., Minagawa H., Takeda A., Matsuura Y., and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 4139-4145 (2000).
- 5) Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, 42, 145-152 (1999).
- 6) Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30, 1064-1076 (1999).
- 7) Shimoike T., Mimori S., Tani H., Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. *J. Virol.*, 73, 9718-9725 (1999).
- 8) Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- $\alpha$  promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Vaccine*, 18, 675-680 (1999).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).

## 2. 学会発表

- 1) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Abrignani S., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of HCV envelope proteins. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June, 1999, Bethesda, USA.
- 2) Tamura K., Ishii K., Suzuki R., Manabe N., Miyamoto H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein and envelope proteins. (同上)
- 3) Matsuura Y., Tani H., Suzuki R., Ishii K., Houghton M., Abrignani S., Whitt M., and Miyamura T. Infection mechanism of the pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. (同上)
- 4) Tani H., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. Efficient gene expression in mammalian cells by novel baculovirus vectors, XIth International Congress of Virology, August, 1999, Sydney.
- 5) Matsuura Y., Ishii K., Takikawa S., Tamura K., Tani H., Suzuki R., Suzuki T., Houghton M., Abrignani S., Whitt M., and Miyamura T. Characterization of hepatitis C virus envelope proteins. (同上)

## G. 知的所有権の取得状況

特になし。

19990429

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

### 「研究成果の刊行に関する一覧表」

- 2) Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Asakura H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 5066-5074 (2000).
- 3) Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. *Virology*, 270, 229-236 (2000).
- 4) Tatsuo H., Okuma K., Tanaka K., Ono N., Minagawa H., Takeda A., Matsuura Y., and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 4139-4145 (2000).
- 5) Suzuki R., Suzuki T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. Processing and function of hepatitis C virus proteins. *Intervirology*, 42, 145-152 (1999).
- 6) Sabile A., Perlemuter G., Bono F., Kohara K., Demaugre F., Kohara M., Matsuura Y., Miyamura T., Brechot C., and Barba G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*, 30, 1064-1076 (1999).
- 7) Shimoike T., Mimori S., Tani H., Matsuura Y., and Miyamura T. Specific interaction of core protein of hepatitis C virus with genomic RNA. *J. Virol.*, 73, 9718-9725 (1999).
- 8) Nishimura Y., Kamei A., Uno S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., and Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- $\alpha$  promoter elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Vaccine*, 18, 675-680 (1999).
- 9) 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).

- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) Missale G., Cariani E., Lamontana V., Ravaggi A., Rossini A., Bertoni R., Houghton M., Matsuura Y., Miyamura T., Fiaccadori F., and Ferrari C. Effects of interferon treatment on the anti-viral T cell response in hepatitis C virus genotype 1b and genotype 2-infected patients. *Hepatology*, 26, 792-797 (1997).
- 20) Miyamura T., Takeda N., and Matsuura Y. Emerging and re-emerging hepatitis viruses. *FEMS Immunol. and Med. Microbiol.*, 18, 307-312 (1997).
- 21) Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., and Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells including non-hepatic cells by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.*, 78, 2657-2664 (1997).

- 22) Moriya K., Yotsuyanagi H., Ishibashi K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Miyamura T., and Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J. Gen. Virol.*, 78, 1527-1531 (1997).
- 24) Koike K., Moriya K., Ishibashi K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Kurosawa K., Matsuura Y., and Miyamura T. Sialadenitis resembling Sjogren's syndrome in hepatitis C virus transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 233-236 (1997).
- 25) Barba G., Harper F., Harada T., Kohara M., Goulinet S., Matsuura Y., Eder G., Schaff Zs., Chapmann M.J., Miyamura T., and Brechot C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 1200-1205 (1997).
- 26) Ruggieri A., Harada T., Matsuura Y., and Miyamura T. Sensitization to Fas-mediated Apoptosis by Hepatitis C Virus Core Protein. *Virology*, 229, 68-76 (1997).
- 27) Yap C-C., Ishii K., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Shimizu H., Ueno Y., Miyamura T., and Matsuura Y. A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*, 231, ~~182-191~~ (1997).