

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 垣生園子

平成 13 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究	6
垣生園子	
II. 分担研究報告	
1. ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究	11
猪子英俊	
2. ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究	14
橘 裕司	
3. ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究	18
佐藤健人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別冊	26

様式A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

厚生労働大臣 坂口 力 殿

平成 13 年 4 月 9 日

住 所 〒206-0012 東京都多摩市貝取 2-6-6-40,
フリカ・ナ ハブ ソコ
研究者 氏 名 垣生 園子
(所属施設 東海大学医学部)

平成 12 年度厚生科学研究費補助金 (高度先端医療 研究事業) に係る研究事業を完了したので
次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) ヒトB細胞由来の抗体作製に関する研究(H10-血液-005)

国庫補助金精算所要額 : 金 30,000,000 円也

1. 厚生科学研究助成金総括研究報告書概要版

研究費の名称＝平成12年度厚生科学研究費助成金

研究事業＝ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究

国庫補助金精算所要額＝30,000,000

研究期間（年度）＝1998-2000

主任研究者名＝垣生園子（東海大学医学部）

分担研究者名＝猪子英俊（東海大学医学部）、橘 祐司（東海大学医学部）
佐藤健人（東海大学医学部）

研究目的＝ヒト型抗体は、有効な治療法がないウイルス疾患、自己免疫病或いは移植に新しい治療法を提供できると期待されている。しかし、現存するヒト・キメラ抗体やヒト抗体遺伝子をもつマウス由来のいわゆるヒト型化抗体では、マウスのアミノ酸配列やマウス型糖鎖を含むため、有効性や安全性の面から問題が残っている。この点を克服することを目指して、本研究ではヒト B 細胞由来のモノクローナル抗体を得ることを、2つの側面からアプローチしている。本年度は昨年開発した遺伝子工学的手法を駆使して、新たに感染症の病原体に対する抗体を患者の末梢ヒト B 細胞から作製した遺伝子ライブラリーから得る。加えてすでに得られた抗体遺伝子について、量産の方法および高親和性の獲得を試みる。一方では、希望する抗原特異的抗体を産生できるように、B 細胞を含むヒト免疫系が再構築されたモデル動物を作製し、抗原刺激を加えて抗原特異的抗体産生を試みる。

研究方法＝1. 昨年までに確立した遺伝子工学的手法により、トキソプラズマおよび熱帯熱マラリア感染症患者から採取した末梢ヒト B 細胞から直接 RT-PCR 法で抗原遺伝子ライブラリーを作製する。続いて、その遺伝子産物に関してコロニーウエスタンブロット法を施行し、特異性をスクリーニングして新たなモノクローナル抗体を2. 昨年までの研究で得た抗体分子の生物活性を、虫体への接着、虫体による赤血球貪食能で調べる。3. 作製抗体の親和性亢進への試み：作製した4抗体遺伝子の L 鎖における1アミノ酸の置換を、変異配列を含むプライマーを用いたリコンビネーション PCR で抗体遺伝子を増幅してお

こなう。3. 効率的な抗体分子の獲得：イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーを組み合わせて検討する。4. ヒト造血幹細胞移植 NOD-SCID マウスによる抗原特異的抗体産生の誘導：ヒト CD34+細胞移植後 6 週間目のマウスを T 細胞依存性抗原 (DNP-KLH) で刺激をし、さらにヘルパー T 細胞を代替するため抗ヒト CD40 抗体を投与する。経時的に、親和性の高い抗原特異的 IgG 抗体産生の状態を、血清を用いて ELISA 法で検討する。

結果と考察= 1. トキソプラズマ症および熱帯熱マラリア患者の末梢血から、遺伝子工学的的手法により虫体と反応するクローンを各々 2 株と 1 株得た。これらの特異性および活性については、現在解析中である。2. 昨年度までに得たヒト B 細胞から作製した抗体遺伝子ライブラリー由来抗体の機能活性：無症候性赤痢アメーバ嚢子輩出者およびアメーバ性肝膿瘍患者の抗体遺伝子ライブラリーからコロニーウエスタンブロット法により選択された Fab 抗体は、赤痢アメーバ虫体によるヒト赤血球貪食嚢や CHO 細胞への接着能を阻止した。3. 高親和性抗体への改変：赤痢アメーバ虫体に対する抗体の 1 つの L 鎖 CDR3 の 8 番目にアルギニンを他のアミノ酸に置換し、抗虫体抗体を産生していたクローンを BIACORE 解析すると、最も親和性の高いクローンはバリンあるいはフェニールアラニンに置換されたものであった。4. 昨年作製した抗体 (抗 HBs および抗 TNF α 抗体) の量産の試み：(a)L 鎖と H 鎖の合成を 1 つのプロモーターでドライブした方が量産できることが判明した。(b) 抗体を疎水性カラムに吸着する際硫酸濃度を低下させ、溶出後の液を陽イオン交換カラムで精製することによって、純粋に効率よく抗体を精製することができた。5. ヒト免疫系再構築を試みたモデルマウスに、TD 抗原である DNP-KLH を免疫すると、抗 CD40 抗体投与を受けた場合に、抗原特異的なヒト B 細胞由来の IgG 抗体が検出された。しかし、同抗原をマウスに免疫した場合に比較すると、1/1000 以下であった。以上の結果は、これまで懸案であったヒト型抗体を病原体感染患者由来のヒト B 細胞から遺伝子工学的的手法により得られることを示したばかりでなく、親和性の高い或いは効率良い抗体をえられることが証明され、抗体後量への応用が実現される期待を強めた。また、作製されたモデルマウスで抗原特異的ヒト型 IgG 抗体産生が誘導された今回の結果は、抗体価および量に関して検討の余地を残しているが、感染患者に頼らなくても希望する抗体が作製され得る系が開発されたことを意味しており、今後のさらなる改良と活用が期待される。

結論= 遺伝子工学的的手法を組み合わせることにより、新たにトキソプラズマと熱帯熱マラリア感染症の患者末梢血から B 細胞を得てモノクローナル抗体を得

た。これまでにクローニングして来たヒトモノクロナール抗体の中には、病原体の機能阻止をもつものを見出した。さらに、CDR のアミノ酸を置換することによって作製した抗体の親和性を高めることに成功した。また、実用的な観点から問題となっている抗体の量産についての検討では、プロモーターに関して抗体産生ベクターを改良する一方、作製された Fab 抗体の精製方法を改良することにより、従来法より効率の良い結果を得た。本研究のもう1つの柱である、希望する抗体を産生するヒトB細胞が、ヒト免疫系再構築モデルマウスで得られることが世界ではじめて証明された。しかもそのヒト抗体は抗原特異的 IgG 抗体であったので、治療に有用な抗体産生のモデルマウスを作製することに精巧知多と考える。

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

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

ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究

主任研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

研究要旨

本研究では、ヒト B 細胞由来の臨床応用可能な抗体を得ることを目指して、2つの系開発を展開している。本年度は、1) 昨年までに開発した遺伝子工学的手法を利用して、(a) 感染症患者の末梢血由来 B 細胞から、新たに<モノクロナール抗体として、昨年度に加えてさらに>トキソプラズマと熱帯熱マラリアに対するモノクロナール抗体を得た。(b) 同方法により昨年までにクローニングして大腸菌で増幅した赤痢アメーバに対する抗体の中から、虫体の機能阻止機能をもつ抗体を見出した。(c) さらにそれら抗体の CDR 3 のアミノ酸を置換することによって抗体の親和性を得ることに成功した。(d) 実用的な観点から問題となっている抗体の量産についての検討では、プロモーターに関して抗体産生ベクターを改良する一方、作製された Fab 抗体の精製方法を改良することにより、効率の良い結果を得た。2) 本研究のもう1つの柱であるヒト免疫系再構築モデルマウスを作製して、免疫原に対して特異的なヒト IgG 抗体を世界ではじめて作製可能であることを証明した。

研究分担者 猪子英俊 東海大学医学部
教授
橘 祐司 東海大学医学部
助教授
佐藤健人 東海大学医学部
講師

化抗体では、マウスのアミノ酸配列やマウス型糖鎖を含むため、有効性や安全性の面から問題が残っている。この点を克服することを目指して、本研究ではヒト B 細胞由来のモノクロナール抗体を得ることを、2つの側面から開発する。本年度は具体的には、遺伝子工学的手法を駆使して、病原体に対する抗体を産生している末梢ヒト B 細胞から抗体遺伝子を得る。加えてすでに得られた抗体遺伝子については、量産の方法および高親和性の獲得を試みる。一方では、希望する抗原特異的抗体を産生できるように、B細胞を含むヒト免疫系が再構築されたモデル動物を作製し、抗原刺激を加

(5) 研究目的

ヒト型抗体は、有効な治療法がないウイルス疾患、自己免疫病或いは移植に新しい治療法を提供できると期待されている。しかし、現存するヒト・キメラ抗体やヒト抗体遺伝子をもつマウス由来のいわゆるヒト型

えて抗体産生を試みる。

B. 研究方法

1. 昨年までに確立した遺伝子工学的手法により、トキソプラズマおよび熱帯熱マラリア感染患者の末梢血からB細胞を得て、抗体遺伝子ライブラリーを作製する。続いて、その遺伝子産物に関してコロニーウエスタンブロット法にてスクリーニングをおこなう。

2. 昨年までの研究で得た抗体分子の改良、生物活性 およびアミノ酸置換：1) 赤痢アメーバに対する抗体2クローンの各H鎖に同一ドナー由来のL鎖を組み合わせて大腸菌で新たに抗体を作らせる。2) 赤痢アメーバ栄養型虫体およびCHO細胞を抗体で前処理することによって、抗体の接着状況と虫体による赤血球貪食能阻止機能を調べる。3) 作製した4抗体遺伝子のL鎖における1アミノ酸の置換を、変異配列を含むプライマーを用いたりコンビネーションPCRで抗体遺伝子を増幅しておこない、抗体の親和性の変化を引き出す。

3. 効率的な抗体分子の獲得：イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーを組み合わせる。

4. ヒト造血幹細胞移植 NOD-SCID マウスによる抗原特異的抗体産生の誘導：ヒトCD34+細胞移植後6週間目のマウスをT細胞依存性抗原(DNP-KLH)で免疫する。同時にそれらマウスはヘルパーT細胞を代替するために、抗ヒトCD40抗体を隔日に投与する。1週ごとに採血して、親和性の高い抗原特異的IgG抗体産生の状態を、血清を用いてELISA法で検討する。

(6) 研究成果

1. トキソプラズマ症および熱帯熱マラリ

ア患者の末梢血から、これまでに確立した遺伝子工学的手法により、虫体と反応するクローンを各々2株と1株得た。これらの特異性および活性については、現在解析中である。

2. 昨年度までに得たヒトB細胞から作製した抗体遺伝子ライブラリー由来の抗体活性：無症候性赤痢アメーバ嚢子輩出者およびアメーバ性肝膿瘍患者の抗体遺伝子ライブラリーからコロニーウエスタンブロット法によって選択された2Fab抗体をさらにH鎖とL鎖を組み替え、抗体が認識した虫体精製抗原と結合した抗体をスクリーニングした。それら抗体は赤痢アメーバ虫体に加えると、ヒト赤血球貪食能およびCHO細胞への接着能を阻止した。

3. 高親和性抗体への改変：赤痢アメーバ虫体に対する抗体の1つのL鎖CDR3の8番目にアルギニンを他のアミノ酸に置換した。これら200クローンは間接蛍光法およびBIACORE解析すると、最も親和性の高いクローンはバリンあるいはフェニールアラニンに置換されたものであった。

4. 昨年作製した抗体(抗HBsおよび抗TNF α 抗体)の量産の試み：(a)L鎖とH鎖の合成を1つのプロモーターでドライブした方が2つのプロモーターを使用した場合より、量産出ることが判明した。(b)抗体を疎水性カラムに吸着する際硫酸濃度を低下させ、溶出後の液を陽イオン交換カラムで精製することによって、純粋に効率よく抗体を精製することができた。

5. ヒト免疫系再構築を試みたモデルマウスに、TD抗原であるDNP-KLHを免疫すると、抗CD40抗体を投与したマウスでは、抗原特異的なヒトB細胞由来のIgG抗体が明らかに高く産生されていた(抗CD40抗体非投与群に比較して10-

50倍)。しかし、その抗体価はマウスに免疫した場合に比較して、1/10000以下であった。ヒトB細胞に分化したB細胞がマウスに比較して極めて少ないことが1つの原因かと思われる。

(7) 考察

上述した研究成果は、ヒト型抗体を病原体感染患者由来のヒトB細胞から遺伝子工学的手法により得られることを示したばかりでなく、親和性の高い抗体を得る操作も可能であることを示した。さらに懸案となっている効率良く抗体を量産する方法が開発され、臨床応用への実現が高くなった。

一方、昨年までの研究成果で開発したモデルマウスに、抗CD40抗体を投与してヘルパーT細胞機能を代替することによって、免疫した抗原に特異的ヒト型IgG抗体産生が誘導された今回の結果は、抗体価および量に関して検討の余地を残しているが、感染患者に頼らなくても希望する抗体が得られ系が開発されたことを意味し、今後の活用が期待される。

E. 結論

遺伝子工学的手法を組み合わせることにより、新たにトキソプラズマと熱帯熱マラリア感染症患者の末梢血由来B細胞からモノクローナル抗体を得た。一方、昨年までにクローニングして大腸菌で増幅した抗体について機能を検索した結果、赤痢アメーバ虫体の機能阻止をもつものを見出した。さらに、CDRのアミノ酸を置換することによって作製した抗体の親和性を高めることに成功した。また、実用的な観点から問題となっている抗体の量産についての検討では、プロモーターに関して抗体産生ベクターを改良する一方、作製されたFab抗

体の精製方法を改良することにより、従来法より効率の良い結果を得た。本研究のもう1つの柱である、希望する抗体を産生するヒトB細胞が、ヒト免疫系再構築モデルマウスで得られることが世界ではじめて証明された。しかもその抗体は抗原特異的IgG抗体であったので、治療に有用な抗体作製のモデルマウス作製に成功したと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1). Satoshi Nunomura, Takehito Sato, Sonoko Habu, Molecular Basis for Functional Maturation of Thymocytes: Increase in c-fos Translation with Positive Selection. J.Immunol., in press, 2000

(2). Tetsuya Saito, Yoshihiro Kumagai, Taichi Hiramatsu, Masaru Kurosawa, Takehito Sato, Sonoko Habu, Kenichi Mitsui, Yoh Kodera, Misao Hiroto, Ayako Matsushima, Yuji Inada, Hiroyuki Nishimura. Immune Tolerance Induced by Polyethylene Glycol-Conjugate of Protein Antigen: Clonal Deletion of Antigen-specific Th Cells in the Thymus. J. Biomaterials Science, Polymer Edition. in press, 2000

(3). Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Rumi Takato, Satoshi Hachimura, Takehiko Sato, Akio Ametani, Yoshihiro Kumagai, Sonoko Habu, Shuichi Kaminogawa Primary response of native CD4+ T cells to amino acid-substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns:

Th1- and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. FEBS Letters 465:28-33, 2000

(4). Katsuto Hozumi, Ryo Ohtsuka, Daisuke Suzuki, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito, Takashi Nishimura, Matthias Merkenschlager and Sonoko Habu Establishment of efficient teaggregation culture system for gene transfection into immature t cells by retroviral vectors. in press, Immunol. Lett., 2000

(5). Kan Shida, Satoshi Hachimura, Akio Ametani, Mina Ishimori, Mei Ling, Masaki Hashiguchi, Sonoko Habu and Shuichi Kaminogawa. Serum IgE response model using allergen-specific T cell receptor transgenic mice. J. Allergy Clin. Immunol. in press. 2000.

2. 学会発表

(1) 佐藤健人 (東海大・医・免疫)、布村聡、林啓太郎、佐竹正延、垣生園子「胸腺分化における転写因子 AML1 の役割」 Kyoto T Cell Conference 2000 年

(2) 妹尾誠 (東海大・医・免疫)、餅田尚子、真貝洋一、垣生園子「T細胞分化過程における TCR β enhancer(E β)の機能的意義」 Kyoto T Cell Conference 2000 年

(3) 妹尾誠 (東海大・医・免疫)、LiLi Wang, 真貝洋一、垣生園子「TCR β 鎖の対立遺伝子排除はインプリンティング現象ではない - 350kb large deletion mouse を用いて -」 Kyoto T Cell Conference 2000 年

(4) 布村聡 (東海大・医・免疫)、佐藤健人、垣生園子 「ポジティブセレクションにおいて c-fos 翻訳能と翻訳開始因子

eIF-4E の発現は相関する」 Kyoto T Cell Conference 2000 年

(5) 玉内秀一 (北里大・医・微生物) 吉田由紀、佐藤健人、八村敏志、上野川修一、垣生園子 「腫瘍特異的 T細胞クローンアナジー誘導による in vivo 抗腫瘍効果の解析」第4回基盤的癌免疫研究会総会 2000 年

(6) 妹尾誠 (東海大・医・免疫)、松村泰子、森俊之、岡本尚、垣生園子「ヒト扁平上皮癌における p53 類縁遺伝子 p51/p73L の転写制御崩壊」第59回日本癌学会総会 2000 年

(7) 玉内秀一 (北里大・医・微生物)、伊藤守、小沢秀行、渡辺直融、寺島直純、高秀華、穂積勝人、垣生園子「GATA3 転写因子は In vivo 免疫反応における IL-5 産生を制御する」第30回日本免疫学会総会 2000 年

(8) 餅田尚子 (東海大・医・免疫)、吉田由紀、佐藤健人、梶垣伸彦、八木田秀雄、奥村康、垣生園子「胸腺細胞負の選択における TRAIL の関与」第30回日本免疫学会総会 2000 年

(9) 平松太一 (桐蔭横浜大・人間科学工学センター)、黒沢大、齊藤哲也、熊沢善博、佐藤健人、垣生園子、小寺洋、廣戸三佐雄、松島瑞子、稲田祐二、西村裕之 「ポリエチレングリコール修飾抗原による抗原特異的免疫寛容誘導」第30回日本免疫学会総会 2000 年

(10) 齋藤雄紀 (東海大・医・外科)、亀谷美恵、餅田尚子、安藤潔、垣生園子 「ヒト免疫系再構築マウスによる抗原特異的抗体産生系の開発」第30回日本免疫学会総会 2000 年

(11) 八幡崇 (東海大・医・免疫)、土屋いずみ、高秀華、細谷俊彦、中内啓光、垣

生園子「造血系における gcm の発現解析」
第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(12) 家森正志 (京都大・医・成人・老年病病態学)、若月芳雄、吉田優、渡辺智裕、白井泰彦、垣生園子、千葉勉、飯塚忠彦、北徹、「経口免疫は胃粘膜における T 細胞のサイトカイン産生能を制御する」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(13) 吉田優 (京都大・医・成人・老年病病態学)、若月芳雄、渡辺智裕、白井泰彦、家森正志、垣生園子、千葉勉、北徹「抗原特異的実験大腸炎における経口免疫寛容誘導療法の検討」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(14) 矢島俊樹 (名大・医・病態研・生体防御)、西村仁志、佐藤健人、垣生園子、桑野博行、吉開泰信「IL-15 依存性メモリータイプ CD8T 細胞の Th1 誘導における橋渡しの役割」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(15) 妹尾誠 (東海大・医・免疫)、WANG Lili、餅田尚子、松村泰子、真貝洋一、垣生園子「T 細胞レセプター β 鎖再構成および対立遺伝子排除における E β の機能的意義」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(16) 布村聡 (東海大・医・免疫)、佐藤健人、林啓太郎、佐竹正延、垣生園子「転写因子 AML1 は胸腺ポジティブセレクションに伴う機能的成熟に重要である」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(17) 11 月 14 日～16 日 亀谷美恵 (東海大・医・免疫)、片野いくみ、佐藤健人、垣生園子「特異抗原産生における IL-4 の抑制作用—TCR-Tg マウスによる解析—」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(18) 佐藤千春 (東海大・医・免疫)、佐藤健人、垣生園子「胸腺ストローマ細胞の膜上分子は DP 細胞の SP 細胞への移行

及び IL-2 産生能獲得を誘導するが選択後の増殖を誘導しない」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(19) 根岸宏樹 (東海大・医・免疫)、布村聡、佐藤健人、垣生園子「胸腺 CD4+8+ 細胞の抵反応性は翻訳開始因子 eIF-4E の発現低下と関連する」第 30 回日本免疫学会総会 2000 年

(20) 垣生園子 (東海大・医・免疫「胸腺細胞の分化と増殖」第 20 回日本胸腺研究会 2001 年

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

“ヒト CD34 世旺盛細胞による免疫構築キメラマウスとその用途”の表記で、平成 12 年 5 月 5 日非付で日本出願手主好きが完了した。出願番号は“特許 2000-147467”である。

3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書

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

ヒト B 細胞由来抗体の大量産生方法の開発

分担研究者 猪子英俊 東海大学 医学部 教授

研究要旨

ヒト B 細胞にエプスタイン・バー・ウイルス(EBV)を感染させ、一切の処理をせずただ継続培養して得られたオリゴクローンのライブラリより各種の得られた抗体について大量培養、大量生産のための検討や改良を行った。

また昨年度の引き続き抗体産生ベクターのさらなる改良をを行い、大腸菌での抗体生産効率を調べた。またいくつかの抗体についてキャラクタリゼーションを行った。

研究協力者 竹腰正隆 東海大学 医学部
講師

A. 研究目的

これまで報告したようにヒト抗体産生の方法として我々は EB ウイルストランスフォーム法と大腸菌による抗体産生法を組み合わせたオリゴクローン法の開発を行った。この方法により有用なヒト抗体が取得できることをこれまでに証明した。今年度は得られた抗体の大量生産に向けた一連の検討を行い、ベクターの改良等を行った。さらに大量精製法についても検討を行った。

一方、我々の手法で作られる Fab 抗体は、1 価であるため実験方法によってはうまく機能しないことがある。そこでベクターの改良を行って 2 価として抗体が産生されるものを昨年度作製した。このベクターでは産生されるタンパクの分子量が 70K を越えるためか大腸菌での産生は難しい。そこでさらなるベクターの改良を行った。

B. 研究方法

抗体の大量生産に関しては大型ジャーファーメンターを用い培養時間、培養温度、培養液組成、IPTG 濃度、IPTG を加える時間等を変えて検討を行った。指標としては抗体のタンパク量と抗体の活性価を ELISA で判定した。また平行して抗体遺伝子がクローニングされたベクターに関しても各種制限酵素で切断を行い、不要な部分の除去を行い改良前後での抗体産生量の変化を調べた。

また大量精製に関してはイオン交換クロマトグラフィーは疎水クロマトグラフィーなどを組み合わせて安価で効率的な方法の検討を行った。精製抗体に関しては SDS-PAGE を行って精製度の検定を行った。

ベクター (pFab-Pho) の改良に関しては、目的の塩基配列を設計し、オリゴヌクレオチドを合成し、目的の部位の制限酵素サイトに導入を行った。得られたクローンに関してはシーケンシングを行って塩基配列の確認を行った。目的のクローンに関して

は実際に抗体遺伝子を導入して抗体の産生を行い、融合して発現するアルカリフォスファターゼの活性を測定した。同時に抗体の活性も ELISA ハで測定した。

C. 研究結果

1. 抗 HBs 抗体

抗体の大量生産に向けて研究を行っている。抗体産生ベクターにおいて L 鎖と H 鎖の合成を別々のプロモーターでドライブしていたのを 1 つのプロモーターに集約した。この方が大量生産時に両鎖の産生がバランス良く行われることが判明した。またこれまで H 鎖に付加されていたヒスチジンタグは臨床応用時には不要であるのでベクターから除去した。さらに大量培養のために大型ジャーファーメンター (10L) による培養の検討を行い、培養条件によって培養 28 時間では従来のフラスコを用いた方法より収量が 10 倍以上になることを見いだした。

また従来の抗 FAB 抗体を用いたアフィニティ精製法は大量生産には向かないため、抗体の精製法について検討を行った。その結果、疎水カラム (HiTrap Phenyl カラム) では 2M 硫酸存在下で吸着し、硫酸濃度を 1.5M まで低下させることによって溶出することができた。溶出液は陽イオン交換カラム (HiTrap SP) でさらなる精製を検討した。pH6.0 ハでカラムに吸着させ、塩濃度のグラジエントによって単一のバンドとして抗体を回収することができた。これにより従来のアフィニティ精製法よりも安価にかつより純粋に精製する方法が見いだされた。

2. 抗 TNF- α 抗体

昨年度、抗体産生ベクター pFab-His2 の H 鎖の 3'末端に大腸菌のアルカリフォスファターゼが融合して産生するベクター pFab-Pho の開発を行った。アルカリフォスファターゼはダイマーを形成するため、このベクターで Fab 抗体を作らせるとあたか

も IgG のような構造と分子量で産生されることになるため、BIACORE での解析が可能になると考えた。このベクターで抗体を産生させたところ、タンパク量としては非常に少なかった。そこでベクターのさらなる改善を試みた。基本的に大腸菌で大量に生産することは困難であるので、大量に生産して精製法によって抗体を集める方が得策であると判断した。これまでの FLAG タグでは精製法が高価であるためそれほど利用できなかった。そこで Hisx10 タグ (ヒスチジンが 10 個) の付加を行った。得られたベクターに関してシークエンシングを行い正しい塩基配列が挿入された事を確認した。発現実験で得られた Hisx10 タグ融合 Fab は Ni-NTA カラムで精製を行った。SDS-PAGE で精製されたことが確認された。現在は最適な産生条件を検討している。

3. 抗 CD4 抗体

昨年度得られた数種の抗 CD4 抗体に関してマウスの抗 CD4 抗体で中和活性を持つ Leu-3a 抗体とのコンペティション ELISA を行った。その結果、得られた抗 CD4 抗体に関しては中和活性が認められなかった。このため現在、さらに別のオリゴクローンに関して抗抗 CD4 抗体のスクリーニングを行っている。

D. 考察

これまでに B 細胞の EBV 感染により得られたオリゴクローンより各種抗体遺伝子を抽出して大腸菌で発現させることに成功したクローンについて、大量生産・大量精製の検討を行ったが問題なく行えることが判明した。産生量も飛躍的に増大し、また精製に関しても非常に安価にかつ高い精製度が得られるようになった。今後得られた抗体の実用化に向けての動きが加速するものと期待される。また抗体産生ベクターの改良により、実験室レベルでの精製にも向上が見られた。オリゴクローン法によるヒト抗体の取得やその後のプロセスに関して有用で実用的な方法の開発が行えたと思わ

れる。

E. 結論

オリゴクローン法によるヒト抗体の取得の容易さをこれまでに証明してきたが、さらに大腸菌を用いた抗体の大量生産・大量精製についても容易に行えることが判明した。我々の開発した抗体の産生方法は臨床応用に耐える抗体産生法であると考えられる。今後、得られた抗体の実用化を目指してさらに研究を進めていくものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Cheng XJ, Ihara S, Takekoshi M, Tachibana H. *Entamoeba histolytica*: Bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits in vitro adherence of trophozoites. *Exp Parasitol* 2000 96:52-56.

(2) Cheng XJ, Watanabe K, Ihara S, Takekoshi M, Tachibana H. Bacterial expression of a human monoclonal antibody that inhibits in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 2000 31(4 Suppl):S311-2

2. 学会発表

(1) 矢野 明、森田 詠子、花田 信弘、竹腰 正隆 受動免疫法のためのリコンビナント抗体の作製 第4回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2000

(2) 矢野 明、竹腰 正隆、森田 詠子、花田 信弘 *Streptococcus mutans* の細胞表面抗原を認識するリコンビナント抗体の作製 第23回日本分子生物学会年会 神戸 2000

(3) 竹腰正隆、前田史子、長塚靖子、小野魁、井原征治 オリゴクローン法を用いた抗CD4ヒト抗体の作製 第23回日本分子生物学会年会 神戸 2000

(4) 竹腰正隆 大腸菌を用いたヒト抗体の作製 日本動物細胞工学会主催 第4回動物細胞工学シンポジウム 次世代医薬としてのモノクローナル抗体の臨床展開 東京 2001

(5) 02 戸田美賀子、竹腰正隆、奥村純市、村松達夫 マウスにおける抗ヒトB型肝炎ウイルスモノクローナル抗体遺伝子導入と血中への発現 第98回日本畜産学会大会 仙台 2001

ヒトB細胞由来の抗体作製に関する研究

分担研究報告書 病原微生物に対するヒト抗体の作製

分担研究者 橋 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨

感染症患者の末梢リンパ球に由来する病原体特異的なヒト抗体 Fab を大腸菌で作製した。無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者およびアメーバ性肝膿瘍患者に由来し、同一の H 鎖と異なる L 鎖から構成される 4 つの Fab 抗体は、いずれも赤痢アメーバ 260-kDaGal/GalNAc レクチンの heavy subunit を認識しており、解離定数は $5.0 \times 10^{-10} \sim 1.1 \times 10^{-9} \text{M}$ であった。これらの抗体で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理することにより、虫体のヒト赤血球貪食能や CHO cell への接着能は有意に抑制された。このうちの 1 抗体遺伝子に人為的変異を導入して L 鎖 CDR3 の 1 アミノ酸を置換し、親和性の高い抗体に改変できた。また、H 鎖をアルカリフォスファターゼとの融合タンパク質として発現させ、酵素活性を保持した状態で精製できた。この他、トキソプラズマ症患者の末梢リンパ球から抗体遺伝子ライブラリーを作製し、トキソプラズマ原虫に特異的に反応する抗体 Fab を得た。

A. 研究目的

細胞工学により作製されたマウスモノクローナル抗体は、病原微生物の抗原解析や感染症の診断に大きな役割を果たし、さらにモデル動物では受動免疫によって感染を阻止できることが報告されている。赤痢アメーバにおいても、虫体表面の Gal/GalNAc レクチンが宿主細胞への接着に重要な役割を果たしており、それに対するマウスモノクローナル抗体は肝膿瘍形成を阻止できることが知られている。しかし、マウス抗体はヒトにとって異種抗体であり、治療や予防のために投与することはできない。もし同様な特異性を持ったヒト抗体を作製できれば臨床応用が可能になると思われるが、細胞融合法ではヒト抗体の作製は困難である。また、可変領域あるいは超可

変領域だけをマウス由来とするキメラ抗体やヒト化抗体においても、マウスのアミノ酸配列が含まれているために繰り返しての使用は難しい。

本研究は感染症の予防や治療に応用できる純粋なヒトモノクローナル抗体を作製することを目的としている。これまでに、アメーバ性肝膿瘍患者と無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の末梢リンパ球に由来する特異的な抗体の作製に成功している。今年度は抗赤痢アメーバヒト抗体について、速度論的解析や機能解析を行う。また、酵素活性を有する Bifunctional 抗体の作製や、抗体遺伝子に人為的な変異を導入することによる親和性の改変についても検討する。更に、今年度はトキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) や熱帯熱マラリア

原虫 (*Plasmodium falciparum*) など、他の重要な原虫に対するヒト抗体の作製にも着手する。

B. 研究方法

無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の抗体クローン CP-33、CP-33 の H 鎖に同一ドナー由来の別の L 鎖を組み合わせた CP-L17、CP-L26、それにアメーバ性肝膿瘍患者由来の L 鎖を組み合わせた LA-L22 を大腸菌で産生させ、His 結合レジンを用いて精製した。速度論的解析のためのリガンドとしては、アフィニティー精製した赤痢アメーバ 260-kDaGal/GalNAc レクチンと Heavy subunit のうちアミノ酸 482 番目から 1138 番目までのシステインリッチドメインを遺伝子組み換えで調製した rLecA をバージニア大学より入手し、使用した。これらのタンパク質を CM5 チップに結合させ、様々な濃度の抗体との結合・解離を BIACORE3000 を用いて測定した。データ解析には BIAevaluation Version3 を使用した。抗体の機能は、抗体で前処理した赤痢アメーバ栄養型虫体の赤血球貪食能と CHO cell への接着能を測定することで評価した。CDR のアミノ酸の置換は、変異配列を含むプライマーを用いたリコンビネーション PCR で抗体遺伝子を増幅することによって行った。間接蛍光抗体法と BIACORE 解析を用いて特異性と親和性を評価した。アルカリフォスファターゼ活性を有する Fab の作製に関しては、H 鎖と大腸菌アルカリフォスファターゼが融合タンパク質として発現されるベクターを用いた。融合タンパク質の検出には抗アルカリフォスファターゼ抗体を用い、酵素活性は p-nitrophenylphosphate を基質として測定した。免疫染色には Vector

Red を基質として使用した。トキソプラズマ症と熱帯熱マラリア患者の末梢リンパ球から RNA を単離し、抗体遺伝子を RT-PCR で増幅し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。スクリーニングは全虫体を用いた間接蛍光抗体法と組み換えタンパク質を用いた ELISA によって行った。

C. 研究結果

1. 抗赤痢アメーバ抗体 Fab の作製と改良

CP-33、CP-L17、CP-L26、LA-L22 を His 結合レジンで精製し、SDS-PAGE を行ったところ、H 鎖と L 鎖が等量認められ、heterodimer を形成していることが確認された。ウェスタンブロットにおいて非還元条件下で 260-kDa 抗原と反応したことから、更に精製抗原を用いたドットブロットにより確認した結果、260-kDaGal/GalNAc レクチン Heavy subunit のシステインリッチドメイン (rLecA) を認識していることが明らかになった。そこで、これらの精製抗原を用いた BIACORE 解析によって結合定数 ($1/M$) と解離定数 (M) を測定した。rLecA をリガンドとした場合、CP-33 は 1.6×10^9 と 6.5×10^{-10} 、以下 9.3×10^8 と 1.1×10^{-9} (CP-L17)、 2.0×10^9 と 5.0×10^{-10} (CP-L26)、 1.9×10^9 と 5.2×10^{-10} (LA-L22) であった。これらの抗体 $100 \mu\text{g}$ で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理したところ、ヒト赤血球に対する貪食能は 33% から 50%、CHO cell に対する接着能は 58% から 65% 抑制された。CP-33 の L 鎖 CDR3 の 8 番目のアルギニンが他のアミノ酸に置換するように、変異を導入した。200 クローンについて間接蛍光抗体法でスクリーニングしたところ、50 コロニーが抗赤痢アメーバ抗体

を産生していた。これらのクローンを更に BIACORE 解析したところ、44 抗体クローンが rLecA に結合した。このうち最も親和性の高かった3クローンについて塩基配列を調べたところ、特に高親和性の2クローンはバリンに、他の1クローンはフェニルアラニンに置換されていた。

2. アルカリフォスファターゼ活性を有するヒト抗体の作製

CP-33 の H 鎖をアルカリフォスファターゼとの融合タンパク質として発現させ、His 結合レジンによって精製した。酵素活性を測定したところ、 4.0×10^{-7} unit/mg であった。この抗体を用いて、ホルマリン固定した赤痢アメーバ虫体を免疫酵素化学的に染色することができた。

3. 他の原虫に対するヒト抗体の作製

トキソプラズマ症患者の末梢リンパ球由来の抗体遺伝子ライブラリーを全虫体抗原でスクリーニングし、虫体と反応する2クローンを得た。この内の1抗体クローンはトキソプラズマ原虫特異的であった。熱帯熱マラリア患者のリンパ球から RNA を単離すると共に、ワクチン候補になっている2種類の組み換えタンパク質に対する血漿の反応性を調べた結果、それぞれ1検体が陽性反応を示した。そこで、これらの患者リンパ球について抗体遺伝子ライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。マラリア原虫特異的なクローンは現時点では得られていない。

D. 考察

大腸菌で作製された赤痢アメーバ特異的なヒト抗体 Fab は、速度論的解析の結果、これらが抗体として十分な親和性を有しているが明らかになった。また、最初のスクリーニングで得られた CP-33 の L 鎖を

reshuffling して再スクリーニングすることにより、約2倍の親和性を有する抗体クローンを得ることができた。CP-33 と LA-L22 の L 鎖 CDR のアミノ酸配列は同一であり、framework の違いによっても抗体の親和性が異なると考えられた。また、大腸菌による発現系では CDR のアミノ酸を人為的に置換することが容易であることが示された。より親和性の高い抗体に改変するだけでなく、エピトープの構造解析にも応用できると思われる。4つの抗体 Fab は赤痢アメーバのレクチンに結合することで、接着阻止や食食抑制効果を示した。この抗体の臨床応用としては、精製抗体による受動免疫の付与に加え、これらのヒト抗体産生大腸菌をヒトの腸内細菌叢に導入できれば、栄養型虫体の腸粘膜への定着を阻止できる画期的な予防法が確立できる可能性がある。アルカリフォスファターゼ活性を有する Fab は、簡便な抗原検出系による診断への応用が期待できる。トキソプラズマ症や熱帯熱マラリアに対しても、赤痢アメーバ抗体クローニングの際に開発した方法で、抗体遺伝子ライブラリーを更にスクリーニングすることにより、臨床応用可能な抗体を作製できると考える。

E. 結論

アメーバ性肝膿瘍患者と無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の遺伝子によって大腸菌で産生された4抗体 Fab は、赤痢アメーバ 260-kDa レクチンの Heavy subunit を認識し、 10^{-10} ~ 10^{-9} の解離定数を有し、虫体の接着能や食食能を抑制できた。この抗体に関して、1アミノ酸置換による親和性の改変や、酵素活性の付加が可能であった。また、トキソプラズマ原虫特異的抗体も作製できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Cheng, X.-J., Ihara, S., Takekoshi, M. and Tachibana, H. (2000) *Entamoeba histolytica*: Bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits in vitro adherence of trophozoites. *Exp. Parasitol.*, 96: 52-56.
- (2) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., Fujita, Y. and Udono, T. (2000) *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, detected in a colony of chimpanzees in Japan. *Parasitol. Res.*, 86: 537-541.
- (3) Cheng, X.-J. and Tachibana, H. (2000) Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii*. *Arch. Med. Res.*, 31: S65-S66.
- (4) Cheng, X.-J., Watanabe, K., Ihara, S., Takekoshi M. and Tachibana, H. (2000) Bacterial expression of a human monoclonal antibody that inhibits in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch. Med. Res.*, 31: S311-S312.
- (5) Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.-J., Tachibana, H. and Tsutsumi, Y. (2000) Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 25: 51-56.
- (6) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., Matsubayashi, N., Gotoh, S. and Matsubayashi, K. (2001) High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive

macaques. *Parasitol. Res.*, 87: 14-17.

(7) Cheng, X.-J. and Tachibana, H. (2001) Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.*, 87: 126-130.

2. 学会発表

- (1) Tachibana, H., Cheng, X.-J. and Kaneda, Y. Cloning and characterization of peroxiredoxin genes from *Entamoeba dispar*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.
- (2) Rivera, W. L., Cheng, X.-J., Takekoshi, M., Ihara, S., Kaneda, Y. and Tachibana, H. Expression of a recombinant Fab fragment of human monoclonal IgA specific for *Entamoeba histolytica*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.
- (3) 程 訓佳、金田良雅、橋 裕司. *Entamoeba moshkovskii* ペルオキシレドキシンの遺伝子クローニングと性状解析. 第41回日本熱帯医学会大会. 2000年10月.

分担研究報告

抗原特異的ヒトB細胞由来抗体獲得を目指したモデルの開発

分担研究者 佐藤健人 東海大学医学部 講師

研究要旨

臍帯血から得たヒト造血幹細胞である CD34+細胞は、免疫不全マウス内でB細胞に分化し、投与抗原に対する特異的抗体を産生誘導する系を開発した。すなわち、昨年までの成果（CD34+細胞は免疫不全マウスの脾臓で CD19+細胞に分化する）に基づき、本年度は幹細胞移植後のマウスを DNP-KLH で免疫した。同時に CD40 から抗原刺激 B 細胞へシグナルを入れる目的で抗 CD40 抗体を投与したところ、DNP に特異的ヒト由来の IgG 抗体が世界ではじめて得られた。一方、がん治療に有用な抗体作製を目指して、細胞傷害性をもつ抗 erbB-2 の抗体作製を開始した。マウス・ヒトのキメラ抗体で同定されたエピトープを含む配列（erbB2143-440）をもとに、17の合成ペプチドを作製し、それらをマウスに免疫したところ、それらペプチドに対する抗体の1つがアポトーシスを誘導できることを明らかにした。このペプチドは、本研究で開発したヒト免疫系再構築マウスに免疫することにより、アポトーシス誘導可能なヒト型抗体を作製することに利用できる。現在、ヒト免疫系再構築マウスに免疫中である。また、同ペプチドは腫瘍細胞傷害性のワクチンとして有用となる。

研究協力者 安藤 潔 東海大学医学部
講師
斉藤有紀 東海大学医学部
大学院生
亀谷美恵 ヒューマンサイエンス・リサーチフェロー

ト型抗体は最も期待されるものであるが、現在治療に応用できる製品はほとんどない。本研究では、希望する抗原に対するヒト抗体を、ヒト免疫系を再構築したモデル動物を作製してヒトB細胞から得ることを目指している。なお、外来抗原に対して免疫系が抗体を産生する際には、B細胞に加えてT細胞および樹状突起細胞（DC）が必要とされるが、昨年度までの研究によって造血幹細胞である CD34+細胞からの DC、T および B 細胞の分化誘導系開発した。本年度は、それらの系を利用して、実際に抗原特異的ヒト型抗体の産生を試みる。

研究目的

薬剤耐性を含む難治性の感染症やがん、或いは移植の生着向上に、抗体が有用であることが動物実験あるいは一部の治療から明らかである。しかし、臨床応用を考える時、有効性と安全性が保証される抗体が望ましい。その意味で、ヒ

B. 研究方法

1. ヒト臍帯血幹細胞移植によるヒト免疫系の再構築:

照射した NOD-SCID マウスにヒト臍帯血から分離した CD34+細胞を移植し、4週後に、末梢血中のヒト免疫細胞の存在を各サブポプレーション特異的細胞表面マーカーにより解析する。

2. 抗原投与と産生抗体の検討:

T細胞依存性 (T cell dependent, TD) および非依存性抗原 (T cell independent, TI) として、DNP-KLH および DNP-Ficoll を上記マウスに免疫する。経時的に採血して、抗原特異的抗体産生の状態を ELISA 法で確認する。

3. CD40 抗体投与による T 細胞機能代替の検討:

IgM から IgG のクラススイッチのためには、B細胞上の CD40 からのシグナルが必要であり、そのシグナルをオンにするリガンド、CD40L はヘルパー T 細胞に発現している。ヒト CD34+細胞移植の NOD-SCID マウスにおける T細胞の機能を補足するために、抗原免疫したマウスに抗 CD40 抗体を2日おきに投与して CD40 からのシグナルを B細胞に入れる。

4. 抗 ErbB-2 認識のエピトープ決定:

今井らの報告に基づき、アポトーシス誘導能をもつ抗体が認識するアミノ酸配列から数残基重複する 20 残基の合成ペプチド 22 種類を作製する。それらの中から、マウスにアポトーシス抗体産生を誘導できるペプチドを選択する。なお、アポトーシスの誘導は、erbB-2 発現のファイブロブラスト (SV22) と抗体の培養後、TUNEL 法にて解析した。

C. 研究成果

1. 末梢血におけるヒト B細胞の出現:

臍帯血由来 CD34+細胞移植後 6 週目の NOD-SCID マウスの末梢血には、ヒト CD45+細胞

は 40%~60%認められた。その内、T細胞 (CD3 陽性) は 1%以下 (平均 0.3%) と少なかったが、CD19 陽性の B細胞は 90%以上を占めた。

B細胞の大部分は IgM+ IgD+CD40+であった。

2. 抗原特異的抗体産生と T・B細胞の出現:

上記マウスに DNP-KLH あるいは DNP-Ficoll を投与し、3週後および6週後に再度抗原を投与したのち、抗体産生状態を血清で調べた。その結果、(第6および第9週における) 抗 DNP 抗体価は、DNP-ficoll 免疫マウスでは DNP-KLH の場合に比較して 3-4 倍の値を示した。しかしながら、その大部分は IgM であった。各抗体価を測定したマウスの免疫組織を系を検索したところ、胸腺では 90%以上がヒト由来 T細胞であり、CD4 と CD8 を指標にすると生理的環境と同様に CD4+8+(DP)細胞、CD4 単独陽性 (CD4SP) 細胞および CD8 単独陽性 (CD8SP) 細胞が認められた。しかし、脾臓やリンパ節では末梢血と同様に B細胞は CD45+細胞中で高い割合を占めたが、T細胞は 0.3-0.8% (平均 0.5%) であった。抗原免疫6週後のマウスではヒト CD45+細胞の割合が 10%前後となるので、末梢における T細胞絶対数の少ないことが、TD 抗原に対する低い抗体産生に反映されていると推測された。

3. 抗 CD40 抗体投与による抗 DNP 抗体産生の亢進:

2の場合と同様なプロトコルで DNP-KLH を免疫して、IgG クラスの抗 DNP 抗体を測定すると、抗原投与後隔日に抗 CD40 抗体投与を受けたマウスでは、血清中の抗体の濃度は 9-190ng/ml で抗 CD40 抗体非投与群 (0.6-21ng/ml) 6-36 倍 (平均して 10 倍強) 高い値を示した。この値は通常マウスに同抗原を投与した場合に比較するとかなり低い (約 1/10000) が、B細胞の絶対数が少ないことに起因すると推測している。この系によって抗原特異的ヒト IgG 抗体がえられたことは、