

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

Non-typable *Haemophilus influenzae* 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究

所属 国立国際医療センター研究所 感染・熱帯病研究部
研究者 橋本 雅仁

要 旨

Non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) 由来のリポオリゴ糖 (LOS) 抗原に対するペプチドミミックの作製を検討した。まず、臨床分離 NTHi 株から LOS を抽出した。LOS を抗原としてマウスを免疫し、LOS を認識する抗体を3種類得た。現在ファージディスプレイライブラリを用いたペプチドミミックの選択を検討している。

1. 研究目的

Haemophilus influenzae を原因とする感染症は現在においても重要な問題である。莢膜を有する *H. influenzae* type b (Hib) 等の強毒菌は、血中や組織に進入した際に貪食殺菌に抵抗し増殖することから、髄膜炎をはじめとする重篤な感染症を引き起こすことが知られている。特に乳幼児に対しては死亡率も高いことから、病原因子である莢膜をターゲットとした莢膜多糖-キャリアタンパク質複合体ワクチンが開発され、小児の髄膜炎の減少に大きく役立っている。一方で、莢膜を持たない Non-typable *H. influenzae* (NTHi) も肺炎・気管支炎等の呼吸器感染症の起原菌として大きな割合を占めている。現在のところ NTHi 感染症の治療には、ampicillin 等の抗生物質が用いられている。しかし、多くの細菌同様に耐性菌が出現したことから、臨床において問題となり始めており、感染予防のためのワクチンが望まれている。しかし NTHi は、Hib 等の強毒菌に存在する主要な病原因子である莢膜多糖を持たないことから、実用的なワクチンの開発はいまだに成功していない。現在のところ、NTHi において抗原として重要な役割を果たしている外膜タンパク質 (OMP) やリポオリゴ糖 (LOS) といった表層成分を対象にしてワクチン開発の基礎研究が行われている段階である。このうち OMP は NTHi の気道粘膜への接着に関与していると考えられており、これに対する抗体は感染予防に重要であると考えられる。一方 LOS は細胞接着への関与以外に、感染部位において炎症反応を引き起こす原因にもなっていると考えられるため、これに対する抗体が感染予防だけでなく炎症の軽減にも働く可能性があり、より重要である。しかし、一般に LOS に代表される糖成分はT細胞非依存性であるため、乳児には効果を発揮しないという欠点がある。これを解消するためには、Hib ワクチンで用いられているようにT細胞依存性であるキャリアタンパク質に糖成分を結合し複合体とする方法が考えられ、研究がおこなわれている。一方で、糖成分に対して三次元構造的に類似性のあるペプチドミミックを作成し、これを抗原として用いることでT細胞依存性にする方法も考えられる。ペプチドは合成も容易であり、コスト面や保存性からも、ワクチンとして実用化できれば非常に有用であると考えられる。そこで LOS 抗原を対象として構造的に類似性のある新規のペプチドミミックを開発し、ワクチンへの応用を検討することを目的とした。本研究では、臨床分離 NTHi 株から LOS を抽出し、これに対する抗体をマウスを用いて作成後、ファージディスプレイライブラリ法を用いてペプチドミミックの選択を検討した。

2. 研究方法

菌株および培養

NTHi IMCJ 1-8 の 8 株は国立国際医療センターから、NTHi Thai 1-20 の 20 株はタイのチェンマイ大学医学部から供与を受けた。NTHi であることは、タキソストリップ X、V、X V (BBL) を用いた発育因子要求テスト、および莢膜多糖タイピングキット (デンカ生検) を用いた凝集試験によって確認した。培養は次のようにしておこなった。まず冷凍保存菌を、チョコレート寒天を用いて 37℃、5% 炭酸ガス雰囲気下にて 24 時間画線培養した。次に単コロニーを銚菌し、1.5% フィルズエンリッチメント (Difco) を含んだブレインハートインフュージョン培地 (Difco) を用いて 37℃、18 時間培養し、遠心分離によって集菌した。

LOS の抽出

LOS は、温水フェノール法を用いて以下の手順で抽出した。乾燥菌体を水に分散後、等量の 90% フェノールを加え 68℃ で加熱攪拌した。これを氷冷後、遠心分離して水層を得た。フェノール層に等量の水を加えた後、再度同手順にて抽出を行った。水層を合わせた後、2 倍量のアセトンを加え遠心し LOS を沈殿させた。沈殿は 70% エタノールを用いて 2 度洗浄した。水に溶解した後、デオキシリボ核酸分解酵素 (5 µg/ml, Sigma) ・ リボ核酸分解酵素 (10 µg/ml, Sigma) を加え 37℃、3 時間加温、ついでプロテナーゼ K (0.5 mg/ml, Sigma) を加え 60℃、12 時間加温し、核酸とタンパク質を分解した。超遠心分離によって LOS を沈殿させた後、凍結乾燥することで LOS を得た。

LOS の脱リン酸化反応

LOS の脱リン酸化はフッ化水素酸を用いておこなった。1.5 ml チューブ中で LOS 100 µg を 48% フッ化水素酸 10 µl に溶解し、4℃、24 時間静置した。減圧下フッ化水素酸を除去し脱リン酸化 LOS を得た。

LOS のオリゴ糖部分の単離

10 ml のガラス試験管中で LOS 10.4 mg を 1% 酢酸 2 ml に溶解し、窒素雰囲気下で 100℃、2.5 時間加熱した。遠心分離によって、不溶物を除去した後、上清を Bio-Gel P-4 カラム (1.5 cm × 80 cm, Bio-Rad) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し、オリゴ糖画分を得た。

抗 LOS 抗体の作製

LOS (1 mg/ml)、加熱死菌 (2 mg/ml) を生理食塩水に分散したものを免疫原とし、Balb/C マウスに腹腔内注射することによって免疫をおこなった。抗血清の抗体価の確認はドットブロットでおこなった。免疫は 4 回おこない、最終免疫後 3 日目に脾臓を摘出した。脾臓細胞とミエローマ細胞 (AG8) を 10:1 で混合した後 PEG 4000 を用いて融合させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマは 10% FBS (Gibco BRL)、5% ハイブリドーマセルグロースファクター (フナコシ) を含んだ D-MEM 培地 (Sigma) で培養した。ハイブリドーマのスクリーニングは ELISA 法でおこなった。すなわち LOS を炭酸バッファ (pH 9.6) に溶解し 96 穴プレート (Corning) に入れ一晩インキュベートして固定化した。その後ハイブリドーマ培養上清を加えて抗体を結合させ、ついでペルオキシダーゼ標識化抗マウス IgG (H+L) 抗体 (KPL) を結合させ、TMB 試薬 (Bio-Rad) を用いて発色をおこなった。クローニングは限界希釈法によって 3 回おこなった。抗体のサブタイピングは、マウスモノクローナルアンチボダイイソタイピングキット (Amersham pharmacia) を用いておこなった。

抗体産生細胞の培養および抗体の単離

単クローン抗体産生細胞は、10% FBS、 2×10^5 M メルカプトエタノール (Gibco) を含んだ RPMI 1640 培地 (ナカライ) で培養・継代した。ELISA 試験には、遠心分離後の上清を用いた。また抗体を単離する場合には、CD ハイブリドーマメディウム (Gibco BRL) を用いて培養した。培養上清は遠心濃縮フィルター・ウルトラフリー 15 (Millipore) を用いて濃縮後、HiTrap Protein G (Pharmacia) を用いて精製した。

ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロット

SDS-PAGE は、15%ポリアクリルアミドゲルとミニプロテイン3セル (Bio-Rad) を用いておこなった。ゲル上の LOS は、過よう素酸で酸化した後、銀染色することでの可視化した。また、ウェスタンブロットは、ミニトランスブロットセル (Bio-Rad) を用いてニトロセルロース膜に転写した後、抗 LOS 抗体、ついでペルオキシダーゼ標識化抗マウス IgG 抗体を結合させ、ECL (Pharmacia) にて検出した。

単クローン抗体を用いた NTHi 臨床分離株の分類

ELISA 法を用いて分類を行った。NTHi の菌体懸濁液を 20 秒間超音波を照射することで破碎した後、96 穴プレートに入れ一晩静置して固定化した。単クローン抗体上清、ついでペルオキシダーゼ標識化抗マウス IgG (H+L) 抗体を結合させ、TMB 試薬を用いて発色を行った。

LOS に対するペプチドミミックの作製

抗 LOS 抗体を用いてファージディスプレイライブラリ法によりペプチドミミックの選択を検討した。ファージディスプレイライブラリには、Ph.D.-12 ファージディスプレイペプチドライブラリーキット (BioLabs) を用いた。

3. 研究成果

抗 LOS 抗体の作製

まず、LOS の抽出をおこなった。今回は呼吸器感染症患者から分離した NTHi である、IMCJ1 株および Thai 1 株を用いた。LOS の抽出は定法に従って温水-フェノール法を用いておこなった。その結果、IMCJ1 株の菌体 180 mg、および Thai 1 株の菌体 205 mg から、それぞれ 5.6 mg、5.4 mg の LOS を得た。

次に、抽出した LOS を用い抗体の作製をおこなった。抗体は、LOS と加熱死菌の 1 : 2 (重量比) 混合物を免疫原として Balb/C マウスに免疫することによって作製した。ハイブリドーマ作成後の、抗体生産細胞の出現確率は、IMCJ1 株が 1/490、Thai 1 株が 103/490 であった。スクリーニングおよび単クローン化の結果、IMCJ1 株由来 LOS に対するもの 1 種類 (I5G)、Thai 1 株由来 LOS に対するもの 2 種類 (T3C、T4D) の、合計 3 種類の単クローン抗体を得た。それぞれの抗体のサブタイプは、IgM- κ (I5G)、IgG3- κ (T3C、T4D) であった。

抗 LOS の性質

まず抗体の抗原認識部位について、LOS を用いて検討をおこなった。LOS のウェスタンブロットの結果 (Figure) から、これらの抗体はタンパク質等の他の菌体成分ではなく LOS 本体を認識していることが分かった。また、リピド A (化合物 506) には結合しなかったことから、抗体がオリゴ糖部分を認識していることも分かった。フッ化水素酸を用いて LOS を脱リン酸化すると、T3C は LOS に結合しなくなった (Figure)。このことは T3C がリン酸基を含む構造を認識していることを示している。現在 LOS から精製したオリゴ糖部分について、その化学構造を核磁気共鳴装置と質量分析装置を用いて解析しており、この結果を用いてさらに詳細な抗体の認識部位を検討中である。

次に 28 種の臨床分離 NTHi の菌体を用いて、それぞれの LOS 抗体に対する結合を調べた。NTHi の超音波破碎菌体を抗原として用い、それぞれに対する 3 種の LOS 抗体の結合を ELISA 法によって測定した (Table)。その結果、I5G が 15 株、T4D が 11 株、T3C が 6 株に結合することが分かった。いずれの抗体も結合しないものは 5 株あった。また、これらの抗体結合パターンから、NTHi を 7 種類のサブタイプに分類することができた (Table)。T4D のみが認識するサブタイプ 1 が 7 株、T3C と T4D が認識するサブタイプ 3 が 1 株、I5G のみが認識するサブタイプ 4 が 8 株、I5G と T4D が認識するサブタイプ 5 が 1 株、I5G と T3C が認識するサブタイプ 6 が 3 株、すべてが認識するサブタイプ 7 が 2 株、どの抗体も結合しないサブタイプ 0 が 5 株であった。T3C のみが結合するもの (サブタイプ 2) は存在しなかった。

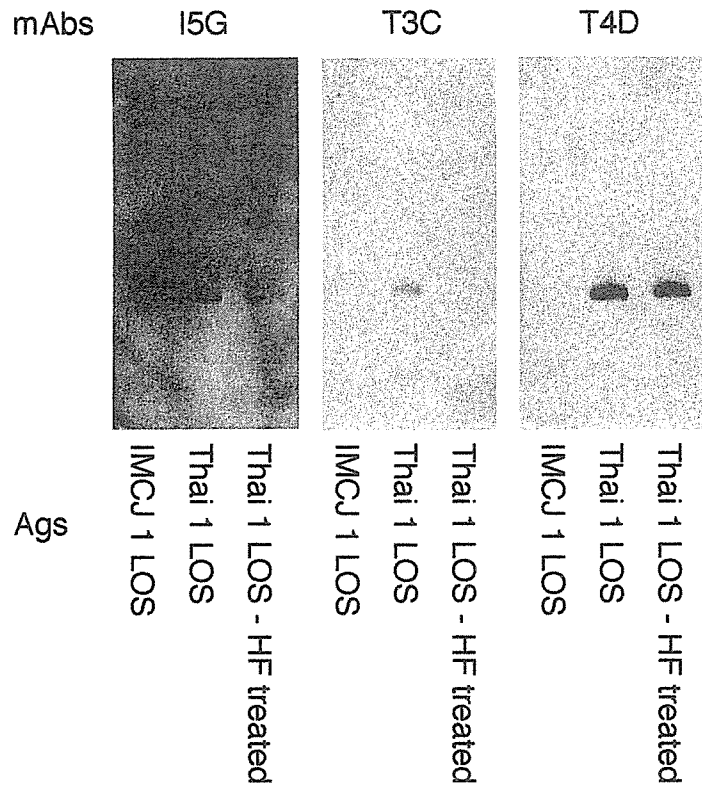


Figure. Western blot of LOS.

Table. Specificity of mAbs directed to clinical isolated NTHis.

NTHi Strains	mAbs			subtype	NTHi Strains	mAbs			subtype
	I5G	T3C	T4D			I5G	T3C	T4D	
IMCJ 1	+	-	-	4	Thai 11	+	-	-	4
IMCJ 2	-	-	-	0	Thai 12	-	-	-	0
IMCJ 3	-	-	+	1	Thai 13	-	-	+	1
IMCJ 4	-	-	-	0	Thai 14	+	-	-	4
IMCJ 5	+	+	-	6	Thai 15	+	-	-	4
IMCJ 6	-	-	+	1	Thai 16	+	-	+	5
IMCJ 7	-	-	+	1	Thai 17	+	-	-	4
IMCJ 8	+	-	-	4	Thai 18	-	+	+	3
					Thai 19	-	-	-	0
Thai 1	+	+	+	7	Thai 20	+	+	-	6
Thai 2	+	-	-	4					
Thai 3	-	-	-	0	IMCJ 1 LOS	+	-	-	4
Thai 4	-	-	+	1	Thai 1 LOS	+	+	+	7
Thai 5	-	-	+	1					
Thai 6	+	+	-	6					
Thai 7	+	-	-	4					
Thai 8	+	+	+	7					
Thai 9	+	-	-	4					
Thai 10	-	-	+	1					

LOS に対するペプチドミミックの作製

ペプチドミミックの選択は、抗 LOS 抗体 T4D を用いておこなった。抗体は、ハイブリドーマの無血清培地上清から、プロテインGカラムを用いて単離した。現在 Ph.D.-12 ファージディスプレイペプチドライブラリーキットを用いてペプチドミミックの選択を検討している。

4. 考 察

ペプチドミミックを選択するためには、まず抗体を作製する必要がある。今回は NTHi の細胞表面糖鎖である LOS をミミックの対象としているので、まず抗 LOS 抗体の作製を行った。LOS は菌株によって構造が異なることが知られている。LOS の構造と病原性との間の関連は調べられていないものの、実際にワクチンとして用いるためには病原性を持つ株の LOS を対象とすることが望ましいと考えた。そこで、臨床分離株である NTHi IMCJ 1 株と Thai 1 株由来の LOS を抗原として用いた。通常免疫をおこなう際には、抗原とフロイントのアジュバントを混合したものを免疫原として用いるが、細菌細胞表層複合糖質であるリポ多糖 (LPS) の抗体作製の場合には加熱死菌をアジュバントの代わりとして用いる方法がよく用いられている。そこで抗 LOS 抗体の作製は、LPS の場合の方法を用いて行った。IMCJ 1 株由来の LOS を用いた場合には、抗血清の抗体価、抗体出現率ともに低く、得られた抗体も IgM であった。一方、Thai 1 由来のものでは、抗体価、抗体出現率ともに高く、得られた抗体は IgG であった。このことは、LOS の構造によって抗原性に大きな差のあることを示しており、LOS の構造によって菌株の病原性に差の出る可能性を示唆している。今後、LOS の構造と病態との関係を詳細に調べる予定である。

今回得た3種の抗体は、LOS のオリゴ糖部分を認識する抗体であり、また臨床分離株への結合性試験から詳細は不明ながらそれぞれ別の構造を認識していることがわかった。しかし、これらの抗体によって認識されない菌株 (サブタイプ0) が約 20% 存在していた。現在のところ、これらの菌株に LOS が存在しないのか、今回の抗体が認識する構造を持たない LOS が存在するののかについては不明である。今後これらの菌株から LOS の抽出を試み、LOS の存在が明らかになればその抗体を作製する必要がある。またこれらの抗体を用いることで、さらに細かく菌株の分類をおこなうことが可能になれば、LOS を用いた新しい NTHi の新しいサブタイピング法として使用できる可能性もある。

ワクチンとして使用出来るペプチドを得るためには、できるだけ多くの NTHi 株に共通に含まれている LOS の構造に対するミミックを得る必要がある。今回得た抗体の中では、I5G が最も多くの菌株 (54%) に結合している。次に多くの菌株に結合した T4D (39%) と合わせると 80% 以上の菌株を認識することができる。そこでこの2種についてペプチドミミックの選択を行うことにした。しかし、I5G が IgM であることを考慮して、まず IgG である T4D を用いて選択を行うことにし、現在検討中である。その後 I5G に対するペプチドミミックを選択し、これらをワクチンとして応用する予定である。

5. ま と め

NTHi 臨床分離株から LOS を抽出し、これに対する抗体を3種作製した。抗体の結合部位の構造解析を一部おこない異なる結合部位を持つことを明らかにした。また、抗 LOS 抗体による NTHi のサブタイピングが可能であることを示した。今後、ペプチドミミックの選択を完了し、ワクチンへの応用研究を行う予定である。

6. 研究発表

該当なし

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社