

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業

病原微生物の増殖を阻害する人工ヒト免疫グロブリンの開発に関する研究

平成13年度総括・分担研究報告書

主任研究者 井原征治

平成14年(2002年)4月

## 目次

I. 総括研究報告	
HCMV gB, gH に対するヒト中和抗体作製に関する研究	
井原征治	3
II. 分担研究報告	
寄生原虫症の予防と治療への応用をめざした人工ヒト免疫	
グロブリンの開発に関する研究	
橘 裕司	7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11

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

HCMV gB, gH に対するヒト中和抗体作製に関する研究

主任研究者 井原征治 東海大学医学部 助教授

**研究要旨** 本研究は、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染症の治療に使用する異種動物のアミノ酸配列を含まない完全ヒトモノクローン抗体医薬品の作製を目的とする。研究推進には2種の方法及び材料を用いたが、第一法は、健常人あるいは感染症の回復期にあり HCMV の増殖を阻害する中和抗体陽性者の血液を材料にし、ファージディスプレイ法で中和抗体遺伝子をクローニングする方法、第二法は染色体断片を有し、免疫によりヒト抗体を産生する KM マウスを使用し、ファージディスプレイ法及びハイブリドーマ法で目的抗体遺伝子をクローニングする方法である。その結果、HCMV 抗体陽性者の血液材料から HCMV 抗 gH IgG 抗体を、またウイルス粒子で免疫した KM マウスからは抗 gB C 端ヒト IgM 抗体遺伝子の分離に成功した。

分担研究者 橋 裕司  
東海大学医学部 助教授

A. 研究目的

臓器移植では、移植成立のため免疫抑制剤が使用されるが、免疫能の低下にともない種々の日和見感染症が合併しやすくなる。免疫抑制の程度は移植臓器の種類によって異なり、腎臓、肝臓などの固形臓器に比べ、骨髄移植では免疫能を最大限低下させる措置が取られる。これは、患者の造血能と免疫能を枯渇させない限り移植骨髄の生着は起きないため、患者骨髄細胞の超致死量の免疫抑制剤の投与と放射線の照射を行う。このような免疫能の完全な枯渇状態では、ウイルスの合併症が生じやすくなり、特にヘルペスウイルス群（単純ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス）による感染症は、患者の多くで発生し、また、重

症化しやすい。このうち、単純ヘルペスウイルスと水痘-帯状疱疹ウイルスはアシクロビルの登場によりほぼ制圧できるようになったが、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）の場合、事態は異なる。特に HCMV による間質性肺炎は発症すると致命的な経過をたどることが多いため、その治療は現在でも困難を極めている。

日本人は成人の80~90%がすでに HCMV に感染しているため、移植患者の多くが潜在 HCMV を持っており、また、同じ理由で、移植後の輸血などによる外来性の HCMV にも曝露されやすい。これらの事情で、骨髄移植で HCMV 感染症が高率で発生する原因となる。

HCMV 感染症には主にガンシクロビルが使用されるが、同剤は移植した細胞の増殖を抑制するという重大な副作用があるため、移植患者の全例に予防措置として用いることはできず、間質性肺炎が予想される患者にのみ予防の目的で使用されている。

HCMV 間質性肺炎を発症した場合の致死率はガンシクロビル単独では 80%以上であったが、ガンシクロビルと HCMV 高抗体価ガンマグロブリン製剤を併用することで 50%以下に改善される事がわかった。つまり、抗 HCMV 中和抗体は間質性肺炎に有効である。しかし、ガンマグロブリン製剤全蛋白質に占める中和抗体量は少量と考えられるし、また抗体価はロット間で差があり、かつ高価であるなどの問題点がある。これらの問題点は、特異性と中和活性が高い人工ヒト抗体を作成すれば解決できる。このような背景から我々は人工ヒト抗体の作製を開始した。本研究の最終目標は、骨髄移植で深刻な問題を引き起こす HCMV 感染症の予防と治療のために、HCMV の全ての中和エピトープに対する抗体を作製し、それらを混合して高抗体価で強力な HCMV 増殖抑制力を持つガンマグロブリン製剤を開発することである。

## B. 研究方法

異種動物の配列を含まない完全ヒトモノクローナル抗体の作製のために (A)ファージディスプレイ法、(B)ヒト染色体断片を持ちヒト抗体を作る KM マウスの免疫、の 2 法でヒト抗体遺伝子の分離を行う。HCMV の中和エピトープは gB と gH にあることが知られている。また、gB には N 端に 1 カ所、C 端に 2 カ所、計 3 カ所の中和エピトープがある。また、gH では中和エピトープ領域の

アミノ酸配列が異なる 2 種類の株 (Towne 株型と AD169 株型) が存在し、一方に対する抗体は他方には効果がない。従って、抗 gH 抗体は 2 種分離する必要がある。以上、HCMV 中和抗体は自然界には 5 種存在することになる。これらの全ての抗体遺伝子を分離する為に、健康人や、HCMV 感染症を発症し、その後回復期にある患者で、これらの中和抗体が高値のヒトをスクリーニングした。抗体価が高値のヒトから献血を受け、B 細胞に EBV を感染する。EBV 感染により細胞は不死化し抗体産生細胞の増殖が期待できる。細胞の培養上清を HCMV gB, gH 抗原を使用して抗体産生ウェルを検索し、陽性ウェルの細胞から RNA を抽出して RT-PCR で抗体 H 鎖 Fd 領域、L 鎖の全領域を増幅した。これらの DNA 断片を FabI-CN 発現ベクターにクローニングし、Fab ライブラリーを作った。このライブラリーを各々の中和エピトープを含む組み換え蛋白質を抗原にした ELISA でスクリーニングをして目的抗体クローンを分離する。

一方で、KM マウスを各種抗原で免疫し、ハイブリドーマ細胞作製とファージディスプレイ法で抗体遺伝子の分離を行った。免疫抗原は、チオレドキシシン融合-gB(Tx-gB), Tx-gH, HCMV 粒子、エピトープアミノ酸配列を含む MAP を使用した。アジュバントは complete および incomplete Freund アジュバント、RIBI アジュバントを使用した。抗体の上昇後に脾臓を摘出してハイブリドーマ細胞を作製した。同時に骨髄を採取し、Fab ライブラリーを作った。

### (倫理面への配慮)

血液提供者に対しては人権には十分に配慮し、採血の際は研究の内容を説明し、書面で承認を得たのち採血を実施している。なお、人工ヒト抗体の作製研究は、東海大学医学部倫理委員会に申請をし、認可を得た。動物実験は、東海大学動物実験委員会の指針にのっとり実験計画書を提出し、承認を得た。

### C. 研究結果

HCMV 抗体価が高値の健常血者から B 細胞を分離して EBV を感染した。培養上清に HCMV 抗体活性が認められたウェルの細胞から RNA を抽出し、Fab ライブラリーを作製した。このライブラリーを MAP-gB N 端、MAP-gH でスクリーニングをかけた結果、MAP-gH (Towne 株型) に反応するクローン 3 株が分離できた。サブタイプはいずれも IgG であった。

HCMV 感染症を発症し、その後回復期にある患者で、抗 gB 抗体、および上記の抗体とは異なる AD169 株型の抗 gH 抗体保有者から血液の提供を受け、EBV 感染を行った。現在までに培養上清のスクリーニングを行い、抗 gB N 端抗体と抗 gH 抗体(AD169 株型)陽性細胞が得られている。今後 Fab 抗体ライブラリーの作製と抗体のスクリーニングを行う。

KM マウスは Tx-gB, Tx-gH, HCMV 粒子で免疫し、抗体の上昇後に骨髄 RNA を使用して Fab ライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。その結果、HCMV 粒子で免疫したマウス由来の Fab ライブラリーから抗 gB C 端ヒト IgM 抗体を分離した。蛍光抗体法による分析で HCMV 感染細胞に特異的に反応し、また中和実験でウイルスを中和する活性のあることを確認した。これら

の抗体は親和活性、中和活性を分析し、優れた活性を示すクローンの選択を行っている。他の抗原で免疫したマウス由来の Fab ライブラリーは現在分析中である。

免疫 KM マウスは、脾臓を摘出してハイブリドーマ細胞を作製した。しかし、現在までに目的抗体産生細胞は得られていない。KM マウスを使用する場合は Fab ライブラリーの作製だけでなく、ヒト抗体産生ハイブリドーマ細胞の樹立が重要である。現在、様々な分子形態の gB, gH 抗原で KM マウスを免疫をしているが、これらを使用したハイブリドーマ細胞の作製を計画している。

### D. 考察

本研究の最終目標は、臨床で感染症の治療に使用できる抗体医薬の開発である。HCMV 中和ヒト抗体は過去に日本とアメリカで 2 種開発され、臨床試験が行われている。各々抗 gB 抗体、抗 gH 抗体であるが、臨床試験では効果を確認できなかった。この結果から二つのことが考えられる。(1) 1 種類の抗体だけでは治療には十分でなく、2 種以上の抗体を混合して使用すべきである。あるいは(2) HCMV には宿主の細胞性免疫、液性免疫をかく乱する現象が有り、関連遺伝子が複数同定されている。この事実から「中和抗体は *in vivo* では効果がなくて当然だ」と考えることもできる。(1) に対しては、我々が分離した抗 gB C 端抗体や抗 gH 抗体を各々単独で使用するだけでなくこれらを混合して相乗効果の有無も必要と考える。さらに今後 gB-N 端、gB-C 端抗体を分離し、全ての中和抗体存在下での相乗作用を調べたい。(2) に対しても当然考慮すべきであり、対策は考えている。

### E. 結論

HCMV に対する抗体価が高値のヒト血液、および HCMV 中和エピトープ領域を含む抗原で免疫した KM マウスの骨髄を材料に、ファージディスプレイ法で Fab ライブラリーを作製し、各々の材料より各 1 種、計 2 種の中和抗体遺伝子の分離に成功した。今後、ヒト血液からはさらに親和活性の高い抗体遺伝子を、また KM マウスからはハイブリドーマ細胞の樹立を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takekoshi M, Maeda F, Nagatsuka Y, Aotsuka S, Ono Y, Ihara S. Cloning and expression of human anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibodies from Epstein-Barr Virus transformed oligoclonal libraries. J Biochem 2001 130:299-303.

##### 2. 学会発表

Y-H Zhou, M Takekoshi, F Meda, S Ihara, M Esumi Expression and characterization of Fab fragment against HVR1 of HCV The VIIIth International symposium of HCV and related viruses. Paris 2001 9

周 乙華、竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治、宇野 正恒、江角 真理子  
Potentially Therapeutic Fab Molecules to Hepatitis C 第 74 回日本生化学学会大会 シンポジウム 抗体エンジニアリング 京都 2001 10/28

周 乙華、竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治、江角 真理子 Production and characterization of Fab fragments against HVR1 of HCV 第 49 回日本ウイルス学会 大阪 2001 11/18

井原 征治、田中 秀則、成瀬 妙子、竹腰 正隆、前田 史子、坂本 朋昭、猪子

英俊 HLAB51 抗原特異的組み換えヒト Fab 抗体の分離と解析 第 24 回日本分子生物学会年会 横浜 2001 12/11

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得 (出願予定)

植物細胞での抗 HBs 抗体の生産

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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

寄生原虫症の予防と治療への応用をめざした人工ヒト免疫グロブリンの開発

分担研究者 橘 裕司 東海大学医学部 助教授

**研究要旨** 赤痢アメーバ症や熱帯熱マラリアなどの寄生原虫症の予防や治療に応用できるようなヒトモノクローナル抗体の作製と改良を試みた。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し、赤痢アメーバの表面レクチンを認識するヒト抗体 CP-33 の遺伝子に人為的な変異を導入してアミノ酸を置換した。L 鎖 CDR3 の 3 番目のセリンをプロリンまたはグリシンに置換した場合に、抗体の親和性が高まることが確認された。また、熱帯熱マラリア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た。ワクチン候補である複数の組み換え型熱帯熱マラリア原虫抗原に対するリンパ球ドナーの血漿抗体価を調べたところ、各抗原に対してそれぞれ高い抗体価を示す検体が確認され、スクリーニング効率の良いライブラリーの選択が可能になった。

A. 研究目的

ハイブリドーマ法によって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ガラクトース (Gal)・N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的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。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。可変領域や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。

本分担研究は特に寄生原虫症の治療や予防

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とともに、さらに親和性の高い抗体へ改変する方法を確立することを目的としている。

今年度は、

これまでに無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の抗体遺伝子ライブラリーから作製した抗体クローンについて、CDR のアミノ酸を人為的に置換して、親和性の改変を試みる。また、熱帯熱マラリア患者由来の抗体遺伝子ライブラリーを作製するとともに、スクリーニングに必要な抗原蛋白質を遺伝子組み換えによって調製する。また、効率よくスクリーニングを行うために、リンパ球ドナー血漿の各種抗原に対する抗体価を検討するなど、抗熱帯熱マラリア原虫ヒト抗体作製のための準備を行う。

B. 研究方法

抗赤痢アメーバ抗体クローン CP-33 の遺伝子を出発材料とし、変異の導入はリコンビネーション PCR によって行った。L鎖 CDR3 の3番目のセリンをコードしている AGT を NNN に置換したプライマーと、相補配列を含む逆向きのプライマーでプラスミド全長を増幅し、その PCR 産物を大腸菌に導入した。IPTG で誘導して抗体遺伝子を発現させ、間接蛍光抗体法で虫体に対する反応性を調べた。反応の強かったクローンについて塩基配列を解析し、どのアミノ酸に置換されたかを明らかにした。異なるアミノ酸をコードするクローンについて、大腸菌を大量培養し、抗体を His 結合レジンで精製した。そして、精製抗体の赤痢アメーバレクチンに対する親和性を BIAcore 3000 を用いて速度論的に解析した。リガンドとしては精製した 260-kDa レクチンと遺伝子組み換えで調製した 170-kDa レクチンサブユニットの一部 (rLecA) を用いた。これらはバージニア大学の Dr. Petri より供与されたものを使用した。

輸入熱帯熱マラリア患者 10 名の末梢血液よりリンパ球を分離し、RNA を精製した。ヒト抗体遺伝子用のプライマーセットを用いて、H鎖 Fd 領域と L鎖をコードする遺伝子を増幅した。これらの遺伝子断片を発現ベクター pFab1-His2 に組み込んで大腸菌に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。熱帯熱マラリア原虫の acidic basic repeat antigen (ABRA) をコードする遺伝子をゲノム DNA より PCR で増幅し、pMAL に組み込んで大腸菌に導入し、maltose-binding protein との融合蛋白質を調製した。組み換え型 ABRA に対する各リンパ球ドナーの血漿の反応性を ELISA で検討した。また、大阪大学微生物病研究所の堀井博士より供与された SERA、大阪工業大学田辺博士

より供与された MSP-1 に対する各血漿の反応性も同様に ELISA で比較した。コロニープロット法で抗 ABRA 抗体産生クローンの 1次スクリーニングを行い、間接蛍光抗体法で 2次スクリーニングを行った。

(倫理面への配慮) 本研究計画については東海大学医学部医の倫理委員会にて審査され、その承認の下に指針に従って実施された。

## C. 研究結果

### 1. 赤痢アメーバ Gal/GalNAc レクチンに対するヒトモノクローナル抗体のアミノ酸置換による親和性改変

リコンビネーション PCR によって変異を導入した 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、37 クローンが陽性であった。このうち特に反応性の強かった 14 クローンについて塩基配列を調べたところ、CP-33 と同じセリンの他に、プロリン、グリシン、アラニン、バリンに置換されていた。プロリンとグリシンに置換されたクローンではセリンの場合と比べて KA 値 (結合定数) が約 10 倍に、KD 値 (解離定数) は約 10 分の 1 となり、親和性が大きく向上したことが確認された。これに対して、アラニンとバリンに置換された場合には親和性に大きな変化はなかった。

### 2. 熱帯熱マラリア原虫に対するヒト抗体遺伝子ライブラリーの作製と評価

各熱帯熱マラリア患者由来のリンパ球から抗体遺伝子 ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) が増幅され、ライブラリーを作製できた。リンパ球ドナーの血漿の反応性に関しては、3種類の抗原に対してそれぞれ異なる検体が特に強い反応性を示した。ABRA に対して  $3 \times 10^4$  のコロニーを 1次スクリーニングし、12 個の陽性シグナルが得られたが、2次スクリーニングで



は原虫に特異的な陽性クローンを確認できなかった。

#### D. 考察

大腸菌による発現系では CDR のアミノ酸を容易に置換することができる。抗赤痢アメーバ Gal/GalNAc レクチン抗体遺伝子の L 鎖 CDR3 の 3 番目の 1 アミノ酸をリコンビネーション PCR 法で置換することにより、約 10 倍高い親和性を示す抗体に改変できた。これまでに同じ遺伝子の CDR3 の 8 番目についてもアミノ酸の置換を試みているが、その場合には大きな親和性の向上は認められなかった。ともにアミノ酸の多様性の大きい箇所でありながら、このような差が見られたのは興味深い。人為的変異導入によるアミノ酸置換はより高い親和性の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。

熱帯熱マラリアに対するワクチンはまだ実用化されていないが、いくつか候補となる蛋白質は報告されている。今回、3 つの候補蛋白質に対してそれぞれ高い抗体価を示す患者由来の抗体遺伝子ライブラリーを作製できた。従って、それぞれの標的蛋白質に適した抗体遺伝子ライブラリーを使用することで効率的なスクリーニングが可能になると思われる。

#### E. 結論

抗赤痢アメーバヒト抗体について 1 アミノ酸を置換することで親和性が向上した。熱帯熱マラリアのワクチン候補である複数の蛋白質にそれぞれ高い抗体価を有する患者由来の抗体遺伝子ライブラリーを構築した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Cheng, X.-J., Hughes, M. A., Huston, C. D., Loftus, B., Gilchrist, C. A., Lockhart, L. A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr. and Tachibana, H. Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infect. Immun.*, 69 (9):5892-5898, 2001

Tanyuksel, M., Tachibana, H., and Petri, W. A., Jr. Amebiasis, an Emerging Disease. *In: Emerging Infections 5*, Scheld, W. M., Craig, W. A. and Hughes, J. M. eds., ASM Press, Washington, D.C., pp 197-212, 2001

##### 2. 学会発表

橋 裕司、渡辺勝臣、程 訓佳、金田良雅. 無症候性嚢子排出者由来の抗赤痢アメーバ人工抗体の作製. 第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会. 2001 年 4 月

程 訓佳、金田良雅、橋 裕司. ハムスターのアメーバ性肝膿瘍形成に対する赤痢アメーバ 150-および 170-kDa 表面抗原のワクチン効果. 第 70 回日本寄生虫学会・第 53 回日本衛生動物学会合同大会. 2001 年 4 月

Cheng, X.-J., Yoshihara, E., Kaneda, Y. and Tachibana, H. Cloning, expression and characterization of a peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii*. XI International Congress of Protozoology. July, 2001.

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Watanabe, K. and Kaneda, Y. Recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica* prepared from peripheral lymphocytes of an asymptomatic cyst passer. XI International Congress of Protozoology. July, 2001.

橘 裕司、中田雄太、程 訓佳、金田良雅、竹腰正隆. 赤痢アメーバに特異的でアルカリフォスファターゼ活性を有する組換え型ヒ

トモノクローナル抗体の作製. 第42回日本熱帯医学会大会. 2001年9月

程 訓佳、塚本秀雄、金田良雅、橘 裕司. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチンの遺伝子クローニングと組換え蛋白質の性状解析. 第71回日本寄生虫学会大会. 2002年3月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
M.Tanyuksel H.Tachibana WA. Petri	Amebiasis, an Emerging Disease	WM Scheid WA Craig JM Hughes	Emerging Infections 5	ASM Press	Washington D.C.	2001	197-212

## 雑誌

1. Takekoshi M, Maeda F, Nagatsuka Y, Aotsuka S, Ono Y, and Ihara S. Cloning and expression of human anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibodies from Epstein-Barr Virus transformed oligoclonal libraries. J Biochem 2001 130:299-303.
2. Cheng, X.-J., Hughes, M. A., Huston, C. D., Loftus, B., Gilchrist, C. A., Lockhart, L. A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr. and Tachibana, H. Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. Infect. Immun., 69 (9):5892-5898, 2001

20010679

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。