

ヒト γ 1/ κ ライブラリーの構築から中和活性を有するヒト型モノクローナル Fab 抗体の作成と完全型 IgG1 抗体への変換

分担研究者：西園晃（大分大学医学部感染分子病態制御講座）

研究要旨：狂犬病ウイルスの曝露後にはその咬傷の程度に応じて能動免疫（ワクチン）の投与と、より高度な曝露の際には受動免疫（グロブリン）の同時投与が推奨されている。しかし抗狂犬病グロブリン製剤は全世界的にも全く品薄で、その供給には以前より限界が指摘されている。コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることにより狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から、2種類のヒト抗体 Fab ライブラリー(RV-1 と RV-2)を構築し、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のある Fab クローンを選択した。RV-1 ライブラリーの 1440 クローンから 1 個の特異的 Fab クローン(GD2D12)、RV-2 ライブラリーの 300 クローンの中から 2 個の特異的 Fab クローン(TC3G7, TC1A10)が選別できた。これらはいずれも狂犬病ウイルスの G 蛋白を認識し、高いウイルス中和能力を示していた。さらに、これらのうち TC3G7 と TC1A10 の 2 つのクローンを完全 IgG 化し、その反応性を検討した。

A. 研究目的

狂犬病はあらゆる温血動物に感染しうる人畜共通神経ウイルス感染症であり、ひとたび発症するとその致死率はほぼ 100%である。全世界における狂犬病による年間の死者数はおよそ 40,000 人から 70,000 人と推測され(WHO)、その多くはアジア、アフリカの国々に集中している。WHO はカテゴリーIII に属する高度の狂犬病ウイルス(RV)曝露後には直ちにワクチンの接種と抗狂犬病抗体製剤(RIG)投

与を推奨しており、適切に行われれば有効な治療(予防)とされている。しかし現在 RIG として使用されているウマ血清およびヒト抗免疫グロブリンは高価で安定的な供給に限界があり、ことにヒト由来の場合副反応や未知のウイルス感染の可能性など問題点も多い。

現在、コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせることによりヒト抗体ライブラリーから感染性疾患の治療に有効なヒト

抗体を選別することが可能になってきている。今回、高い狂犬病ウイルス中和抗体価を有するボランティアの末梢血リンパ球を用いてヒト Fab 抗体ライブラリーを構築し、この中から狂犬病ウイルス中和活性を有するヒト Fab を分離し、さらに完全型の IgG 抗体に変換することに成功したので報告する。

B. 研究方法

1) ウイルス

狂犬病ウイルス西ヶ原株及び challenge virus standard (CVS)株、および HEP-Flury 株(attenuated strain)、街上毒 1088 株(street strain)は当教室にストックしているものを用いた。西ヶ原株はファージのパニング、Glycoprotein (RV G 蛋白)の精製、ELISA 用抗原として用いた。CVS 株は中和活性の評価および免疫沈降反応の抗原として用いた。HEP-Flury 株は中和活性の評価、1088 株は中和活性の評価とマウスを用いた *in vivo* での中和試験のために用いた。

2) RV Glycoprotein (G) 蛋白精製

RV G 蛋白は RV 西ヶ原株から 2% octyl- β -(+)-glucopyranoside を用いて定法に則り精製した。

3) ボランティアへの狂犬病ワクチンの免疫

大分大学医学部倫理委員会によって承

認後、書面による十分な説明と同意のもとに、過去に狂犬病ワクチンの接種歴がある 6 名の健康成人に対して市販の組織培養型狂犬病ウイルス不活化ワクチン (HEP-Flury 株、化血研製)を用いて追加免疫を行った。添付書類に記載されている量を 2 週間おきに 2 回皮下に接種し、接種前、接種後 2 週間経過後に 6 名のボランティアの RV(西ヶ原株)に対する中和抗体価を rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)によって測定した。

4) ヒト V_H/κ Fab ライブラリーの構築

それぞれのボランティアから 100ml の末梢血を採取後 Ficoll-paque gradient を用いた遠心法にてリンパ球を分離し、リンパ球より得られた mRNA から cDNA を合成した。 κ 鎖可変領域(V_κ)および重鎖可変領域(V_H)の DNA 断片を、報告されている V_κ および V_H を全ての germ line をカバーするような primer set を用いて PCR 法にて増幅した。また、 κ 鎖定常領域(C_κ)および Fd region (C_{H1})の DNA 断片も同様に各種 primer set を用いて PCR 法にて増幅した。 V_κ と C_κ 、および V_H と C_{H1} の DNA 断片から overlap PCR 法にて κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を合成した。最終的に κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を overlap PCR 法にて full-length Fab PCR 産物とし、pComb3X phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。full-length Fab PCR 産物を含む pComb3X にて *E.coli* XL1-Blue を電気穿孔法にてトランスフォ

一メーションした。(RV-1 ライブラリー)

同様に最も高い中和抗体価の上昇が見られた1名(図1の△)のリンパ球から、上記と同様の方法に則り vector pComb3H を用いてファージライブラリーを作成し、RV-2 ライブラリーとした。

5) ファージライブラリーのパンニング (生物学的濃縮)

全長 Fab PCR 産物を含む pComb3X, pComb3H にてトランスフォーメーションされた *E.coli* XL1-Blue の培養液に helper phage VCS M13 を感染させることにより phage ライブラリーに変換した。ELISA plate に直接固層化した西ヶ原株 RV virion または 35 mm tissue culture dish に直接固層化した精製 RV G 蛋白を 3% nonfat powdered milk/PBS(-)にてブロック後、ファージライブラリーを affinity binding によりパンニングした。5 cycles のパンニングを行い溶出したファージ溶液を *E.coli* XL1-Blue に感染させ phagemid DNA を精製した。この選択された phagemid DNA にて nonsuppressor *E.coli* top 10 をトランスフォーメーションし、可溶性 Fab を産生させ ELISA 法にて目的のクローンを選別した。

6) 可溶性 Fab 産生クローンの選別

選択した phagemid DNA にてトランスフォーメーションされた nonsuppressor *E.coli* top 10 を 1 クローンずつ無作為に pick up し IPTG にて induce 後、培養上清

をヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ を抗原とした ELISA 法にて可溶性 Fab 産生クローンを選別した。可溶性 Fab 産生クローンのペリプラスムを超音波破碎して大腸菌抽出液(Fab 標品)を作成した。

7) RV 中和試験

ボランティア6名のRVに対する血清中和抗体価はBHK-21細胞とRV西ヶ原株を用いて rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)法にて行い、血清中和抗体価はRV感染細胞による focus 数を50%減少させる血清希釈倍数で示した。また Fab 標品の中和活性は chicken embryo related (CER)細胞とRV CVS 株を用いて RFFIT 法にて行い、RV感染細胞によるフォーカス数によって中和活性を評価した。

8) 選別した Fab 標品の RV-binding capacity

ELISA plate 上に直接固層化した西ヶ原株 RV ビリオンまたは 35 mm tissue culture dish に直接固層化した精製RV G蛋白に対する選別 Fab 標品の結合能を ELISA 法にて評価し、ボランティア血清及びBSAを用いた場合の値と比較した。

9) 中和活性を示す Fab 標品の抗原特異性

Fab 標品の認識するRVタンパクは免疫共沈法にて推測した。RV CVS 株と Fab 標品を反応後、抗ヒトIgG F(ab')₂を加え、抗原抗体複合物を protein G conjugated-Sepharose beads で回収し非還

元化状態下に SDS-PAGE で分離し、Western blottingにて抗 RV G 特異的モノクローナル抗体(clone8-1, 岐阜大学源教授より分与)または抗 RV N 特異的モノクローナル抗体(clone 当教室で作成)を用いて抗原抗体複合物中に含まれるタンパク質を推測した。

10) Fab の塩基配列の決定

Fab の V_{κ} 、 V_H 領域の塩基配列を Fluorescence Dideoxynucleotide Terminator Cycle Sequencing kit を用いて自動 DNA シークエンサーで行った。Software Vector NTI で解析を行い、DNAPLOT software program にてデータベース上のヒト Ig ホモログを検索した。

11) マウスを用いた *in vivo* での Fab 標品の中和活性の評価

街上毒 1088 株を Balb/c マウスの足底から 25 μ l 4LD50 接種し、4 時間後に 180 μ g/ml に調整した Fab TC3G7, TC1A10 を 50 μ l 同側の大腿筋肉内に投与し、その後の生死を観察した。

12) Fab 抗体の完全 IgG 化と精製

感染型の IgG を得る目的で、Fab TC3G7 と TC1A10 の V_{κ} と C_{κ} 、および V_H と C_{H1} の DNA 断片を改めて別個にベクター pFabCMV に挿入し、G418 存在下で約 21 日間培養し、生存してきた細胞を選別した。培養上清中に得られた IgG を Protein G あるいは Protein A カラムで精製し、各種

RV 株感染マウス神経芽細胞腫 NA 細胞に感染させ、FITC 標識抗ヒト IgG (H+L) を 2 次抗体として反応させた。また 7) と同様の中和試験を行った。

C. 研究結果

1) ボランティア 6 名の RV に対する血清中和抗体価

6 名の血清中の狂犬病中和抗体価は BHK-21 細胞を用いた西ヶ原株における RFFIT 法にて測定した。2 回の狂犬病ワクチン接種後、ボランティアの血清抗体価 (最後のワクチン接種から 2 週間後) は 3,162 倍から 22,387 倍にまで上昇し、ワクチン接種前よりも 1.4 から 100 倍高値になっていた(図 1)。この様な血清抗体価は狂犬病ウイルス中和抗体を得るための Fab ライブラリー構築には十分な値と判断した。うち 1 名は boost 接種により非常に高い抗体価の誘導が認められた。(図 1 Δ)

2) ヒト Fab (V_H - C_{H1} / κ)ライブラリーの構築

約 350-bp の軽鎖及び重鎖の可変領域部 (V_{κ} , V_H) DNA 産物を PCR 法にて増幅、また約 350-bp の軽鎖及び重鎖の定常領域部 (C_{κ} , C_{H1}) は pComb3XTT を template として PCR 法にて増幅した。 κ 軽鎖および Fd 部は上記 DNA 産物を用いた overlap PCR にていずれも 750-bp の DNA 産物として構築した。さらに C_{κ} , C_{H1} を用いた overlap PCR にて 1500-bp の全長 Fab DNA 産物を構築し、pComb3X phagemid vector または

pComb3H phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。ライブラリーはそれぞれ 7.0×10^7 , 2.0×10^8 *E. coli* transformants のサイズであった。

3) ファージライブラリーのパンニング (生物学的濃縮)

まず構築したファージライブラリーを ELISA plate に直接固層化した RV 西ヶ原株ビリオンに対して 5 cycles のパンニングを行い、抗原特異的 Fab 発現クローンを濃縮した。又同様に RVG タンパク特異 Fab 発現クローンを濃縮する目的で構築したファージライブラリーを 35mm tissue culture dish に直接固層化した精製 RVG タンパクに対して 5 cycles のパンニングを行い、抗原特異的 Fab 発現クローンを濃縮した。パンニングによって濃縮されたそれぞれのファージミドは可溶性 Fab を発現させるために nonsuppressor *E. coli* top 10 に別々に感染させスクリーニングを行った。RV-1 ライブラリーからは無作為に 1,440 クローン、RV-2 ライブラリーからは無作為に 300 クローンを選別し、抗原を用いたパンニングを行った。その結果、RV-1 ライブラリーからは 15 クローン、RV-2 ライブラリーからは 60 クローンが可溶性 Fab 産生クローンとして選別された。これらクローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液に関して RV に対する ELISA 値が高値であったクローン 12 (RV-1 ライブラリーからは 4 クローン、RV-2 ライブラリーからは 8 クローン)についてさらに

詳細に解析を行った。

4) 選別した Fab 標品の RV 中和活性評価

選別された 12 クローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液 (Fab 標品) について、Fab 産生量の安定性と収量を検討し、さらに各種代表的 RV の株 (HEP-Flury, CVS, 1088) に対するウイルス中和活性の評価を行った。その結果、西ヶ原株 RV ビリオンまたは西ヶ原株精製 RV G 蛋白に対してパンニングを行った RV-1 ライブラリーから Fab 標品 GD2D12、ワクチン抗原を用いてパンニングを行った RV-2 ライブラリーから Fab 標品 TC3G7, TC1A10 が得られた。Fab 標品 GD2D12 は HEP-Flury 株に対しては全く中和活性を示さなかったが、CVS 株と 1088 株には FRNT50 値でそれぞれ $0.46 \mu\text{g/ml}$ と $8.6 \mu\text{g/ml}$ の中和活性を示した。また Fab 標品 TC3G7, TC1A10 については、HEP-Flury 株では $2.7 \mu\text{g/ml}$ と $100 \mu\text{g/ml}$ 以上、CVS 株に対しては $8.9 \mu\text{g/ml}$ と $100 \mu\text{g/ml}$ 以上、1088 株に対しては $11.4 \mu\text{g/ml}$ と $3.7 \mu\text{g/ml}$ であった。特に TC3G7 は検討した全てのウイルスの株に対して *in vitro* での中和活性を示した (表 1)。

5) 免疫共沈法による検討では、RV 中和活性を示した Fab 標品 GD2D12, TC3G7, TC1A10 は抗 RV N 蛋白 monoclonal antibody には認識されず (図 2A lane 4 と図 2B lanes 11, 12)、抗 RV G 蛋白 monoclonal antibody によって認識される (図 2A lane 2

と図 2B lanes 7, 8) 67-kDa の蛋白と反応することより、これら 3 種類の Fab は RV G 蛋白を認識することが推測された。

6) Fab 抗体のアミノ酸配列

RV 中和活性を示した Fab EP5G3 と GD2D12 の塩基配列を決定することでアミノ酸配列を推測し、比較検討した。抗原との結合に特に関係あるとされる重鎖の complementary-determining region 3 (CDR3) と CDR1 は 2 クローン間でアミノ酸配列は大きく異なっていたが、CDR2 は同じものであった(data not shown)。また Fab EP5G3 と GD2D12 の V_H に関してはどちらも V_H III family 由来と推測されたが EP5G3 の V_K は V_K III family、GD2D12 の V_K は V_K II family 由来と推測された。

7) マウスを用いた *in vivo* での Fab 標品の中和活性の評価 (図 3)

In vitro で中和活性を示した Fab のうち、大量培養による精製が可能であった TC3G7 と TC1A10 について、マウスを用いて RV 街上毒 1088 株の末梢 challenge 感染後に Fab を投与し、その感染阻止効果を検討した。その結果 PBS を対照とした場合 11 日後には全てのマウスが死亡したが、Fab 抗体を投与した群では 20% (2/10 TC1A10), 10% (1/10 TC3G7) とわずかながら生存率の向上が認められた。

8) Fab 抗体の完全 IgG 化と精製 (図 4、5、6)

図 4 A に示す発現ベクター-pFabCMV に TC3G7 と TC1A10 クローンの V_K と V_H をそれぞれ挿入し、CHO 細胞にトランスフェクトし G418 存在下で約 21 日間培養し、生存してきた細胞を選別した。G418 存在下で生存可能な細胞は抗ヒト IgG を用いた Immunofluorescence test で殆ど全ての細胞で IgG の発現が確認された(図 4 B)。得られた培養上清は non-reducing の状態では SDS-PAGE 解析で分子量約 150,000 に単一なバンドとして確認でき、2-mercaptoethanol 存在下では IgG の H 鎖、L 鎖に相当する 2 本のバンドを確認した(図 5)。次に CVS, HEP-Flury, ERA, 1088 のそれぞれの RV を NA 細胞に感染させ、発現したウイルス蛋白に対する完全型ヒト IgG 抗体の反応性について抗ヒト IgG を用いた Immunofluorescence test で確認した。その結果 IgG TC3G7 は検討した全てのウイルスに反応していた。一方 IgG 1A10 はいずれにも反応が見られなかった。

D. 考察

昨年の研究から引き続いて、狂犬病ワクチン追加接種後のボランティアの末梢血リンパ球から、免疫グロブリン遺伝子の V_H と V_K 領域を多様性を保持したまま PCR 法にて増幅し、ファージミドベクターに挿入後、ウイルスを特異的に中和する活性を有する Fab を選別すべくファージライブラリーを構築した。RV 特異抗原を用いた生物学的濃縮(パンニング)を繰

り返し、特異クローンの頻度を上げることで、上記のファージディスプレイ法を用いてその中から *in vitro* で狂犬病ウイルス中和活性を示す Fab を選別した。

ライブラリーのソースとなったボランティアの末梢血リンパ球は、複数（6名）由来の RV-1 と単一ボランティア由来の RV-2 から構築されたが、最終的には RV-2 ライブラリーからより効率的に中和活性クローンの選択が可能であった。この事実は、より抗体価の高い個体、つまり過免疫を充分に行う、または感染直後の時期のリンパ球を用いた方が、効率的な選別ができることを示唆している。

また *in vitro* で中和活性を示した Fab を用いて、マウスでの *in vivo* 感染阻止効果を検討したところ、十分な効果は認められなかった。これより選別したクローンについて Fc 部分を有する完全型の IgG 分子に変換し、補体活性化能やオプソニン活性化能を高めた分子を作成しさらなる評価を行うことが必要であると考えられたため、中和活性を有する Fab の V_H と V_K 領域を哺乳細胞発現系に移管し、完全型のヒト IgG 分子として回収することにした。最終的には IgG 3G7 は広く RV 感染細胞に反応することが確認でき、今後 *in vitro*, *in vivo* での感染抑制効果の確認を行う必要があると考えられた。一方 Fab の段階でウイルス中和活性の認められた Fab 1A10 は、完全型 IgG 分子に変換したことで RV 感染細胞への反応性が消失した。不完全な IgG 分子が形成されたため

なのか、原因は不明である。

これまでの報告ではヒトのナイーブライブラリーから生物学的活性を有する Fab 抗体を選別するには、巨大ライブラリー (10^9) が必要とされていた。しかし我々の構築したライブラリーはこれまでの報告と比較するとライブラリーのサイズは中等度のものであったが、immune library であり疾患特異的リンパ球および mRNA を効率的に利用できることで狂犬病ウイルス中和活性を有する Fab を選別することが可能であった。今後はさらに狂犬病ウイルス中和活性が高いクローンをさらに数多く選別し、検討を進める必要がある。

E. 結論

ファージディスプレイ法を用いて狂犬病ウイルスに対して中和活性を有するヒト型 Fab 抗体を作成し、完全型の IgG に転換することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ando T., Yamashiro T., Sonoda YT,

Mannen K, Nishizono A. (2005)

Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiology and Immunology* 49:311-322

2) Khawplod P, Shoji Y, Ubol S,

Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. (2006) Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect Genet Evol.* in press

3) Pakamatz K, Inoue K, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. (2005) A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods* 125: 35-40.

2. 知的財産権の出願・登録状況

「狂犬病ウイルスを効果的に中和するヒト抗体」(特願 2004-332680)

3. 学会発表

1) 安藤忠助, 山城哲, 西園晃. コンビナトリアル・ライブラリーを用いた抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナル Fab 抗体の作成およびその評価 第 42 回日本ウイルス学会九州支部総会 2005 年 7 月 那覇

2) 山城哲, 安藤忠助, 西園晃. 抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナル Fab 抗体の作製と完全型 IgG1 抗体への変換 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 2005 年 11 月 横浜

3) Yamashiro T, Ando T, Nishizono A. Construction of human Fab libraries and isolation of a panel of monoclonal antibodies with rabies virus neutralizing ability. XIII International Congress of Virology. 2005 July San Francisco

4) Nishizono A, Yamashiro T. Isolation and synthesis of a panel of human monoclonal Fab antibodies with rabies virus neutralizing ability from human combinatorial Fab libraries. XXXIX United State-Japan Cooperative Medical Science Program. July 2005, Palo Alto, CA

図表説明

- 図1 リンパ球供血者の血清中狂犬病ウイルス中和抗体価の推移 (RFITT 法)
6名の供血者の狂犬病ワクチン (化血研製) 2回接種後の抗体価の推移。
6名全員を用いて RV-1、最も抗体価の推移の高い1名から RV-2 ライブラリーを得た。
- 図2 確立された3種類のヒト型 Fab 分子が認識する RV 抗原特異性
得られた Fab 2D12, 3G7, 1A10 を RV ビリオン蛋白とインキュベート後、Protein G-Sepharose に結合させた抗ヒト Fab 抗体で免疫沈降。その後沈降物を SDS-PAGE で分離後、抗 RV G または抗 RV N マウスモノクローナル抗体とウェスタンブロット反応させた。
いずれも抗 RV G と特異的反応を示し、得られた Fab は RV の G 蛋白を認識していた。
- 図3 ヒト型 Fab 分子投与による狂犬病ウイルス街上市毒 1088 株に対する防御効果 (マウス生存率)
Balb/c マウスの足底から 4LD50 の RV 1088 株を末梢感染させ、その後同側の大腿筋に Fab、ヒト抗血清、PBS を投与し、マウスの生存率を追跡した。
- 図4 Fab から完全型 IgG 分子への変換
(A) 完全型 IgG 変換のためのベクターの構築
(B) CHO 細胞で発現しているヒト型 IgG 3G7 (FITC 標識抗ヒト IgG(H+L)) を 2 次抗体とした Immunofluorescent test)
- 図5 完全型 IgG 抗体 3G7 の大量培養による精製
IgG 3G7 を発現する CHO 細胞の大量培養から得られた上清を濃縮精製し、SDS-PAGE にて解析。
- 図6 完全型抗体 IgG 3G7 と 1A10 の狂犬病ウイルス株間との反応性
完全型抗体に変換した IgG 3G7 と 1A10 の RV CVS, HEP-Flury, ERA, 1088 株に対する反応性。FITC 標識抗ヒト IgG(H+L) を 2 次抗体とした Immunofluorescent test。

图1

50% focus inhibition titers of volunteers' sera determined by RFFIT

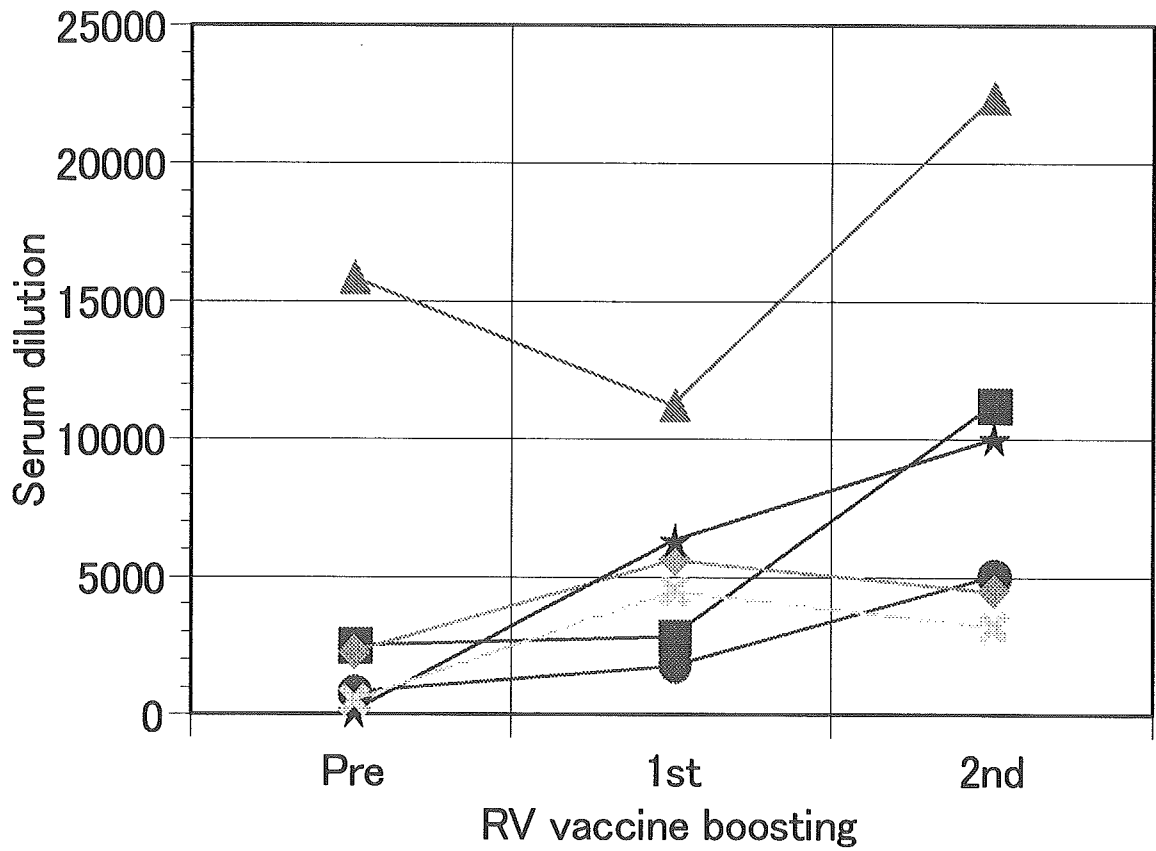


表 1

50% focus reduction neutralizing test
(FRNT₅₀) determined by RFFIT

Fab	Phage Library	HEP Flury	CVS	1088
GD2D12	RV-1	>100	0.46	8.6
TC3G7	RV-2	2.7	8.9	11.4
TC1A10	RV-2	>100	>100	3.7

μ g/mL

图2

RV proteins with which neutralizing Fabs interact (in WB)

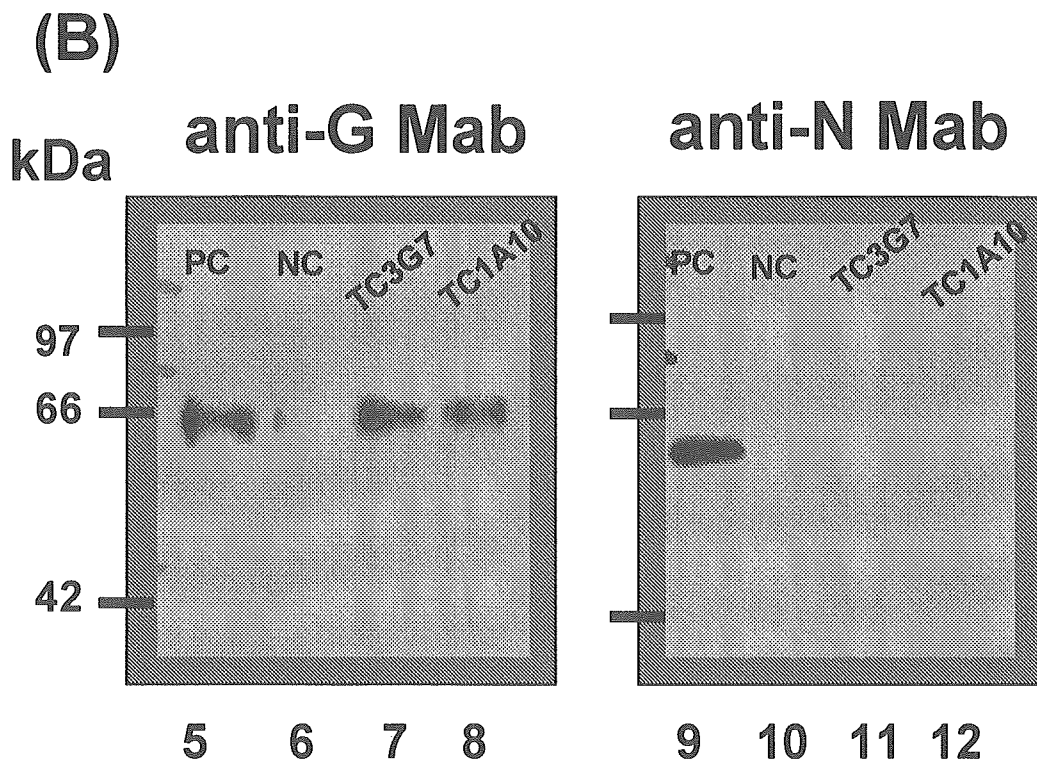
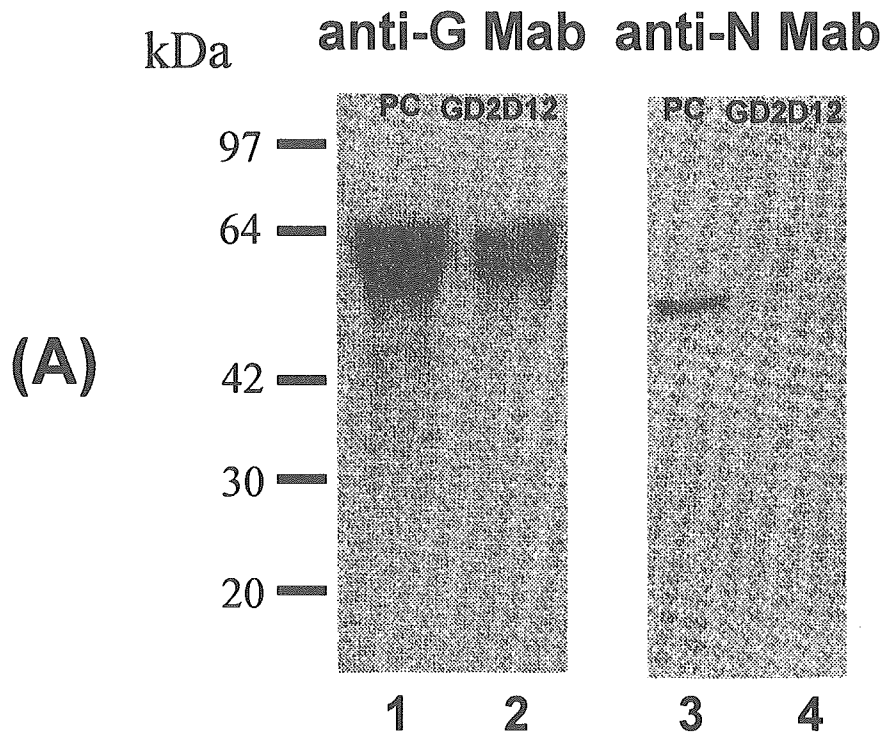


図3

Survival rate of mice inoculated with RV strain 1088 when administered with human monoclonal Fab

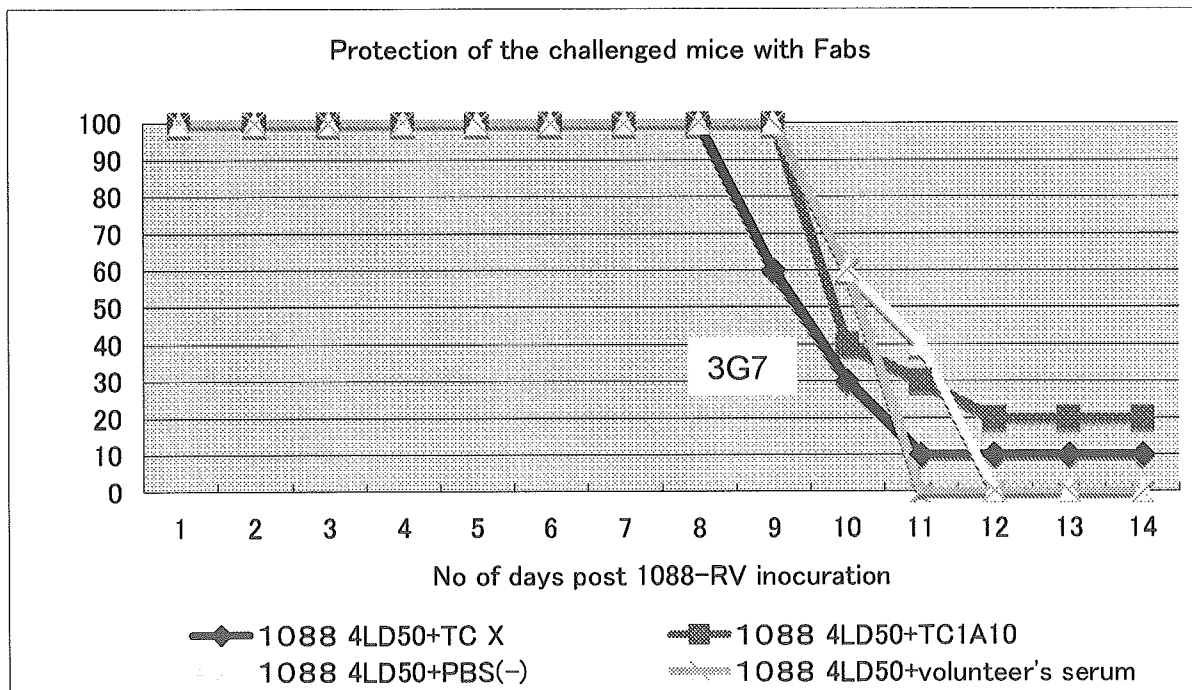
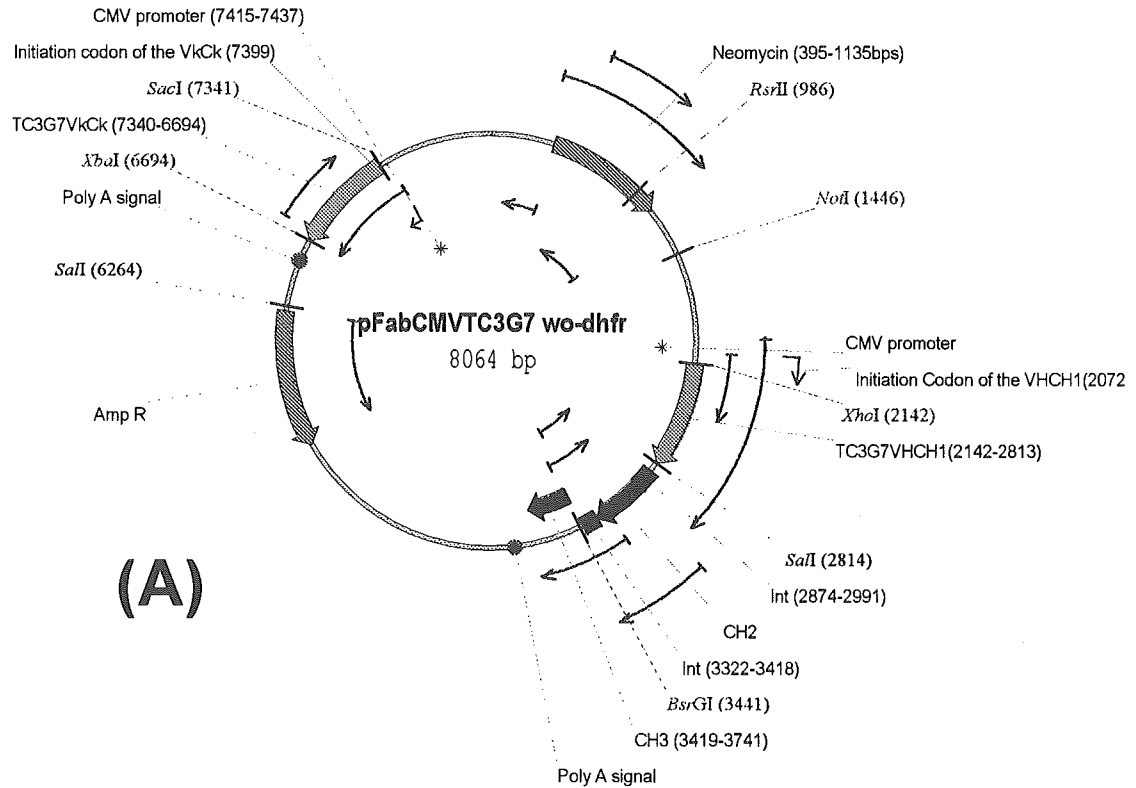


図4

Conversion of neutralizing Fab into whole IgG molecule



(A)

(B)

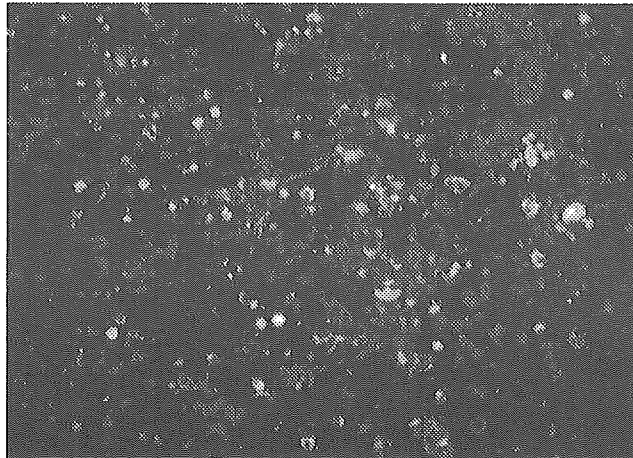
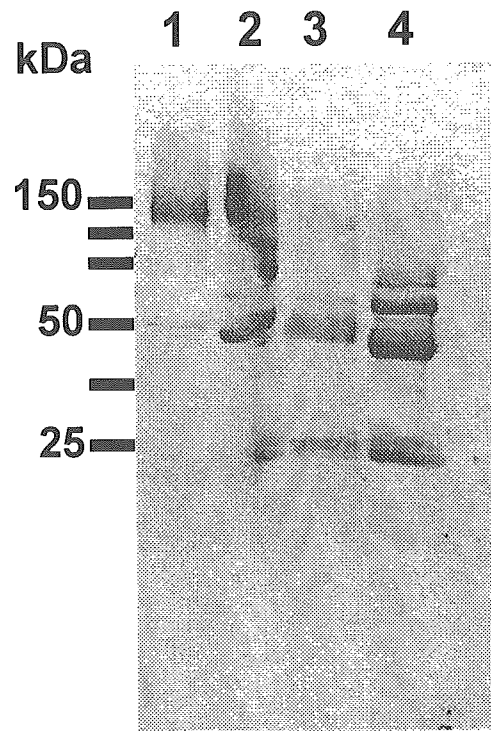


图5

Purification of IgG TC3G7



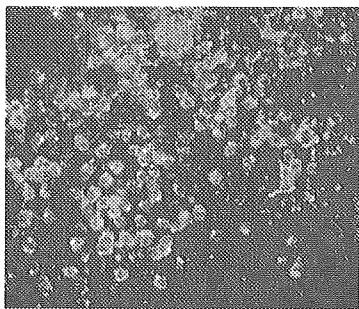
- 1, IgGTC3G7, non-reducing
- 2, Human IgG, non-reducing
- 3, IgGTC3G7, reducing
- 4, Human IgG, reducing

図6

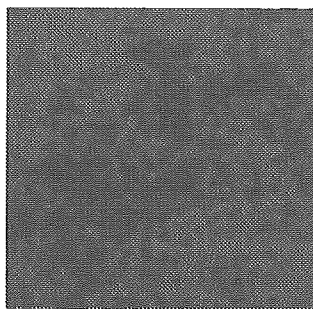
Reactivity of complete IgG converted from Fab (3G7, 1A10) against RV-infected NA cell

	CVS	HEP-Flury	ERA	1088
Complete IgG 3G7	++	++	+	++
Complete IgG 1A10	-	-	-	-
Anti-N MoAb	++	++	++	++

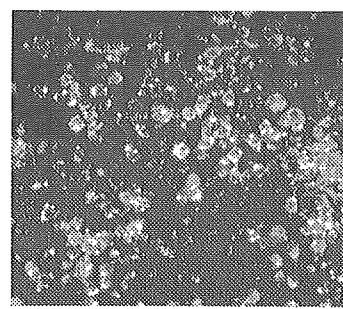
Infection at moi=5



TC3G7 IgG



TC1A10 IgG



anti-RV N
mouse mAb