

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフォトンクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261



KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640



## 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究



## インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究 (平成17年度報告)

所 属 東海大学・工学部・生命化学科  
研究者 浅沼秀樹

### 研究要旨

インフルエンザの変異株をも防御できる治療型単鎖抗体(scFv)の作製を目指し、ファージディスプレイ法を用いたヒトおよびマウス scFv ライブラリーの作製とそれを用いたインフルエンザ結合型単鎖抗体の作製を行なった。また、ファージディスプレイ法を用いた抗インフルエンザ Fab も作製し、その性状を検討した。これらの防御効果を判定するための感染実験系の確立のため、ヒトウイルス株のマウスへ馴化を行い、それを用いた感染実験系の確立を試みた。

- ① 抗インフルエンザ(PR8 株)抗体産生ハイブリドーマよりファージディスプレイ法を用い、scFv の作製に成功した。しかしながら、抗原に対する結合性は著しく低下した。
- ② 抗インフルエンザ Fab を4クローン作製し、1クローンに感染阻止能が認められた。
- ③ ヒトファージ提示型 scFv ライブラリーを用いたインフルエンザ結合型ファージ抗体の選別を行った結果、選別過程でクローンが消失した。
- ④ ヒトインフルエンザウイルスである A/Sydney、B/Nagasaki のマウスへの馴化に成功した。
- ⑤ PR8 ワクチンを経鼻接種したマウスにおける馴化株に対する感染防御実験を行い、A/P 株の抗原性が PR8 株と類似していることが明らかとなった。

### 分担研究者

- (1)東海大学・工学部・生命化学科 山口陽子
- (2)北里大学研究所病院 橋口一弘

### A. 研究目的

インフルエンザは表面抗原が変化するため、現行のワクチンでは防御が難しい。さらに近年、トリ由来の強毒株(H5 型)のヒトへの致死感染も確認されている。そのため変異株が流行した場合には症状の軽減だけでなく、流行地域の縮小のためにも感染者の早期診断ならびに早期治療が必要となる。そして、人医療だけでなく畜産業にも応用できる検出技術や治療薬の開発が、流行の拡大阻止、患者数の減少、しいては経済的な損失も最小限に食い止めるこ

とができる。これには簡易に作製でき、かつ有効な治療型の薬剤の開発が必要とされる。そこで本研究では遺伝子技術を応用した蛋白創生技術であるファージディスプレイライブラリー法を用い、様々なインフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型単鎖抗体(scFv)ライブラリーの作製、および scFv を用いた治療法の開発を目標として研究を行っている。

本計画における今年度の目標は、「マウスを用いたインフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型 scFv ライブラリーの作製」である。様々な抗体の可変領域を持つ scFv のライブラリーを作製し、インフルエンザ抗原と結合性を有する scFv 作製のベースにすることを目的とした。また同時に、作製された scFv の結合性を評価するための陽性標準

scFv の作製を目指し、インフルエンザ特異的ハイブリドーマ由来の scFv 作製、ならびに交叉感染防御能判定のための動物実験系の確立のために、ヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化も検討した。また、当初の計画に加え、scFv に CH1 と CL を付加させた抗インフルエンザ Fab の作製も行い、その機能と性質を検討した。

## B. 研究方法

### a. マウスファージ提示型 scFv ライブラリーの作製 (山口)

BALB/c (6 週齢、メス) マウスの脾臓からリンパ球を分離し、それを用いて mRNA を抽出する。cDNA 化後、VH、Vκ および Vλ のミックスプライマーを用いて PCR を行い DNA プローブの増幅後、assembly PCR のより VH-Vκ もしくは VH-Vλ の組み合わせのリンカー結合型 DNA プローブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、コンピテントセル XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型 scFv (ファージ抗体) を作製する。

### b. 抗インフルエンザ Fab の作製 (山口)

本実験に関しては、GeneFrontier の協力のもとに抗インフルエンザ PR8 HA 分子に対する Fab の作製が行われた。ヒト VL-CL-VH-CH1 遺伝子を assembly PCR により増幅、ベクター pMORPH@X7\_FS に挿入、JM83 にトランスフォームし、ヘルパーファージを用いてファージ提示型 Fab を作製する。また、この Fab には His-Tag が挿入されており、このライブラリーよりインフルエンザ PR8 HA 分子に対し特異的な Fab の選別には、抗 His-Tag 抗体を用いた。パニングには PR8 HA 抗原をコートした 96-well プレートを用いた ELISA 法によって、行なわれた。

### c. 抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマ由来の単鎖抗体の作製 (浅沼)

従来行われている手法を用い、抗インフルエンザハイブリドーマを作製する。BALB/c マウスにイン

フルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34; PR8 株) 抗原を 2 週間毎に 3 回皮下接種し、最終免疫 2 週後に脾臓からリンパ球を回収する。それとミエローマ (SP2O 細胞株) を PEG 存在下で融合させ、PR8 抗原と結合する抗体を産生するハイブリドーマを作製する。それを  $2 \times 10^6$  個用意し、研究方法 a と同様の手法を用いて mRNA を抽出し、VH、Vκ および Vλ それぞれについて PCR を行う。DNA プローブを増幅後、assembly PCR のより VH-Vκ もしくは VH-Vλ の組み合わせのリンカー結合型 DNA プローブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、コンピテントセル XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型単鎖抗体 (ファージ抗体) を産生させる。ファージ抗体からの抗原特異的単鎖抗体の選別からクローニングはパニングにより行う。96-well マイクロプレートにインフルエンザ抗原をコートし産生されたファージ抗体を注入する。結合したファージ抗体を溶出しコンピテントセル (XL-1Blue) に感染させ、ヘルパーファージを用いてファージ抗体を産生させる。この操作を繰り返すことによりハイブリドーマ由来抗原特異的ファージ抗体を作製できる。

### d. ヒトインフルエンザウイルス株のマウスへの馴化 (浅沼)

ヒトインフルエンザウイルス株をマウスに経鼻接種 (20μl) し 3 日後、肺を摘出し 2ml の 0.1%BSA 混合 PBS を用いて洗浄したバッファを肺洗浄液とする。回収された肺洗浄液中のウイルス価をプラーク法により測定し、高いウイルス価を示した肺洗浄液を新たに用意したマウスに経鼻接種する (20μl)。接種 3 日後同様に肺洗浄液を回収し、ウイルス価を測定する。この操作を繰り返し、肺洗浄液中に安定して高いウイルス価を認めた場合にヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化が成功したものとする。なお馴化後のウイルス株は発育鶏卵を用いて増殖させ、初期感染に用いたウイルスの少量接種 (2μl) で免疫したマウスに感染させ防御効果を検討する。これにより完全な感染阻止を示した場合、初期感染



に用いた株と馴化株と間に抗原性の大きな変化はないとする。

#### e. A/Peking 株を感染に用いた、交叉防御効果の検討

BALB/c マウスに様々な濃度の PR8 ワクチン(5.0, 1.0, 0.1, 0.01 $\mu$ g) を CTB\*(2.0  $\mu$ g) とともに少量(2.0  $\mu$ l) もしくは大量(20  $\mu$ l) 経鼻接種し、4 週後、PR8(H1N1)、A/Peking(H1N1)、A/Yamagata(H1N1)、A/Guizhou(H3N2) および B/Ibaraki(Type B) を感染(40LD50)させ 3 日後、鼻腔および肺洗浄液を回収し、プラーク法によりウイルス価を、ELISA 法により抗体価を測定した。

#### f. ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製 (橋口、山口)

ヒト末梢単核球を比重遠心により分離後、mRNA を抽出する。cDNA 化後、VH、V $\kappa$  および V $\lambda$  のプライマーを用いて PCR を行い DNA プローブの増幅後、assembly PCR のより VH-V $\kappa$  もしくは VH-V $\lambda$  の組み合わせのリンカー結合型 DNA プローブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型単鎖抗体 (ファージ抗体) を作製する。

#### (倫理面への配慮)

本研究では実験動物を使用するため、取り扱いについては当大学の実験動物委員会の許可のもと、苦痛の軽減や、安楽死の方法など、動物愛護上の配慮を確実に挙げる。安楽死には高濃度ガス麻酔の長時間吸引法を用いる。また今回使用したヒト材料に関しては、提供者とのインフォームドコンセントを確実に挙げており、個人情報等の守秘義務を確実に果たす。

### C. 研究結果

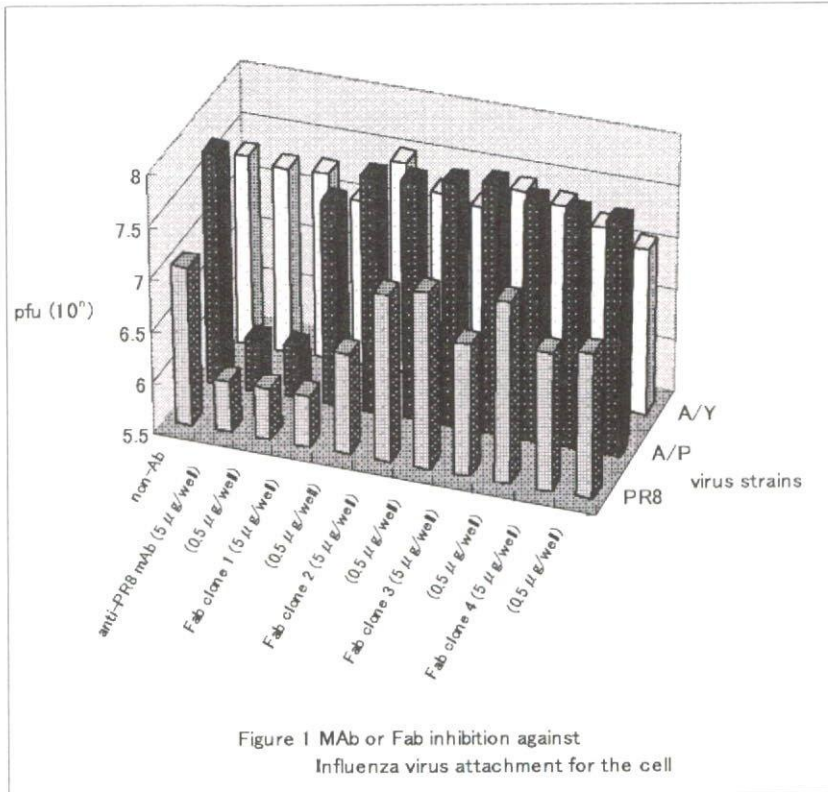
#### a. マウスを用いたインフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型単鎖抗体ライブラリーの作製 (山口)

昨年度、マウスの脾臓リンパ球より VH、V $\kappa$  およ

び V $\lambda$  遺伝子の増幅に成功し、引き続き VH-V $\kappa$  もしくは VH-V $\lambda$  の組み合わせによる assembly PCR を行ったが、リンカー結合型 DNA プローブの増幅は認められなかった。そのため非免疫マウスよりライブラリーを作製する場合には結合プローブの作製が困難になることが明らかとなった。また、共同研究者の浅沼の研究結果より、ライブラリーからの単鎖抗体の選別には、結合力が著しく低下するという問題も抱えた。そのため今年度は、単鎖抗体よりも分子が大きい Fab の作製とその性状の解析を中心に検討を行なった。

#### b. ファージディスプレイ法を用いたヒト Fab の作製とその解析

本ファージ提示型ヒト Fab は GeneFrontier が作製したヒト Fab ライブラリーをインフルエンザ PR8 株由来の HA 抗原でパニングすることによって 4 クローンを獲得した。それぞれのクローンを PR8 HA 抗原でコートしたプレートを用いて ELISA を行なった結果、クローン 1~4 はコントロール値のそれぞれおよそ 28 倍、40 倍、47 倍、49 倍であった。続いてこの 4 クローンの PR8 抗原に対するウエスタンブロットを行なった。還元もしくは非還元 PR8 HA 抗原をメンブレンシートに転写し、抗 PR8 モノクローナル抗体(mAb)および抗 PR8 Fab クローン 1~4 をシートに反応させた後、HRP-抗マウス抗体もしくは抗 His-Tag 抗体を反応させた。続いて抗 His-Tag 抗体に対する HRP ラベル抗体を反応させ、発色基質でバンドを確認した。その結果、全ての Fab クローンに非還元抗原との結合性が認められた。また、これら Fab クローンに還元抗原に対する結合性はほとんど認められなかった。このことから、全ての Fab クローンは PR8 HA 抗原の立体構造を認識していることが示唆された。しかしながら、陽性標準として用いた mAb と比較して、同濃度を用いたにもかかわらず、バンドの濃度が著しく低下していたことから、Fab の結合力も mAb より低いことが示唆される。続いて抗 PR8 Fab の抗ウイルス能を検討した(Figure 1)。PR8(H1N1)、A/P(H1N1) および A/Y(H1N1) 株を段階希釈し、抗 PR8 mAb、抗



の作製を試みた。その結果、VH および VL の DNA プローブの増幅が認められたが、VH・LINKER・VL の組み合わせによる assembly PCR による増幅は認められなかった。そのため本研究項目では、プライマーの再設計を行い、これを assembly PCR に使用した。新たに設計したプライマーを Table 1 に示した。その結果、およそ 700bp 付近に明瞭なバンドが認められた。続いて制限酵素 Sfi1 および Not1 で処理し、pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用い、コロニーの形成を確認した。それらを PCR によりインサートの

PR8 Fab クローン 1~4 とともに MDCK 細胞に感染させ 2 日後、プラーク数を算出し、感染阻止能の検討を行った。その結果、全ての Fab クローンと mAb による A/Y 感染阻止能は認められなかったが、mAb と Fab クローン 1 では有意に PR8 と A/P に対する感染阻止能が認められた。一方、Fab クローン 2~4 には感染阻止能は全く認められなかった。このことから、Fab クローン 1 は HA 分子が細胞表面のシアル酸と結合する部位と特異的に結合し、さらには型の異なる A/P においても交叉反応性を有することが示唆された。しかしながら、陽性標準である mAb と同濃度で反応させたにも関わらず、その阻止能には部分的な低下が認められていた。このことから、Fab 分子も scFv 同様、結合力は完全な抗体分子よりも低いことが示唆される。

確認をした結果、8 クローン中 5 クローンに確認された。この 5 クローンについて PR8 コートプレートを用いて ELISA を行なった。5 クローン中 1 クローンにのみ高い結合性が認められたが、ブロッキングバッファーを 0.1% BSA から Perfect Block へ変更して解析した場合には、全てのクローンにおける PR8 に対する結合性が認められなかった。そのため、この 5 クローンのウェスタンブロットを行ったところ、すべてのクローンに単鎖抗体の存在が確認された。また、シーケンスの結果では、抗体遺伝子との高い相同性が認められた。このことから、ハイブリドーマ由来の単鎖抗体の作製は成功したものの、結合性は極度に低下することが示唆される。

#### c. 抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマ由来の scFv の作製 (浅沼)

昨年度、インフルエンザウイルス (PR8 株) に対するハイブリドーマを作製し、それを用いた scFv

#### d. ヒトインフルエンザウイルス株のマウスへの馴化 (浅沼)

本研究では変異型のインフルエンザウイルス株の防御を目標としているが、その防御効果を実験動物で検討する場合のウイルス株は限られるため、マウ

Table I Primer designation for this experiments (overlap extension)

Overlap extension sense	5' GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGC CGG CCG AGC TCG A 3'
Overlap extension anti-sense	5' GAG GAG GAG GCG GCC GCA CTA GTG ACA 3'



スに馴化されたヒトウイルス株を作製する必要性がある。そのためヒトインフルエンザウイルス株である A/Fukushima/2/88(A/F:H1N1)、A/Wahan/37/95(A/W:H1N1)、A/Peking/262/95(A/P:H1N1)、A/Sydney/5/97(A/S:H3N2)および B/Nagasaki/1/87(B/N:Type B)のマウスへの馴化を行った。昨年度、A/P 株の馴化に成功し、A/F および A/B 株についてはマウスでの継代は終了していた。今年度、引き続き A/S および B/N の馴化と馴化前後の抗原性の相同性について検討した。A/S 株は初感染後の肺洗浄液中に軽度のウイルス価が認められたが 2 代目の肺洗浄液中には認められなかった。そのため、初期感染後の肺洗浄液を発育鶏卵を用いてウイルスの増殖を行い、再度マウスへの感染を行なった。再感染後、2 代目までのマウスの肺洗浄液中にウイルス価が認められていたが、3 代目には再度消失した。そのためウイルス価が認められた 2 代目の肺洗浄液を発育鶏卵を用いてウイルスの増殖を行い感染に用いた。その後安定的にマウスへの感染が認められ、合計 20 世代まで継代を行なった。B/N は 3 代目に発育鶏卵によるウイルスの増殖を行なった以外は順調に継代され、合計 20 世代までの継代を行なった。引き続き、継代株の初代株との相同性を検討するために、マウスに継代株を少量感染し 3 週後、初期株の感染を行った。その結果、全ての継代株で初期株の感染の完全な防御が認められた。このことから、継代株は初期株との抗原性に相違がないことが示唆された。さらに馴化 A/S 株について、50%致死量について検討した結果、 $2 \times 10^4$  pfu であった。

#### e. A/Peking 株を感染に用いた、PR8 ワクチン接種後の交叉防御効果の検討

BALB/c マウスに様々な濃度の PR8 ワクチンを CTB\*とともに少量(2.0  $\mu$ l)もしくは大量(20  $\mu$ l)経鼻接種し、4 週後、PR8(H1N1)、A/Peking(H1N1)、A/Yamagata(H1N1)、A/Guizhou(H3N2) および B/Ibaraki(Type B)を感染(40LD50)させ 3 日後、鼻腔および肺洗浄液を回収し、プラーク法によりウイルス価を、ELISA 法により抗体価を測定した。ワクチンを少量 1 回経鼻接種し、ワクチン株と同じ PR8

を感染させた場合には、0.1 $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群の上気道ならびに 1.0  $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群の下気道で完全な防御効果が認められた。PR8 ワクチンを接種し、A/P を感染させた群では上気道で 1.0 $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群で完全な、下気道では 1.0  $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群で部分的な防御が認められた(Figure 2)。また PR8 ワクチンを接種し、A/Y を感染させた群では下気道では全く防御効果は認められず、5.0 $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群の上気道で部分的な防御が認められた。A/G および B/I を感染させた群では上気道、下気道ともに全く防御効果は認められなかった。このことは株によって交叉防御効果に違いがあることを示唆しており、また、本研究で作製された A/P 株は、同じ H1N1 株の中でも A/Y より抗原性が PR8 と近似であることも示唆された。続いて PR8 ワクチンを下気道までの大量 1 回もしくは 2 回経鼻接種し、A/P、A/Y、A/G および B/I を感染させ交叉防御効果の検討を行った。その結果、A/P に対する下気道での交叉防御効果は 5.0 $\mu$ g のワクチンを 1 回接種した群で完全な、1.0 $\mu$ g のワクチン接種群で部分的に認められ。上気道での交叉防御効果は 1.0 $\mu$ g 以上で完全な、0.1 $\mu$ g で部分的な交叉防御効果が認められ、少量接種時よりも高い防御効果を示した。さらに 2 回接種時には、上気道、下気道ともに 0.1 $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群で完全な交叉感染阻止が認められ、接種回数を増やすことによっても高い交叉防御効果が認められた。このとき、上気道には大量の交叉反応性 IgA 抗体が誘導され、血中にも大量の交叉反応性 IgG 抗体が誘導されていた。このことは、A/P 感染に対する交叉防御効果には、上気道では交叉反応性 IgA 抗体が、下気道では交叉反応性 IgG 抗体が貢献していることが示唆される。A/Y を感染させた場合、PR8 ワクチンの大量 1 回接種では交叉防御効果に改善が認められなかったが、2 回経鼻接種した場合には上気道で 5 $\mu$ g のワクチン接種群で完全な、0.1 $\mu$ g 以上のワクチンを接種した群で部分的な交叉防御効果が認められた。このとき、上気道には大量の交叉反応性 IgA 抗体が誘導されており、上気道での交叉防御に貢献したことが示唆される。しかしな



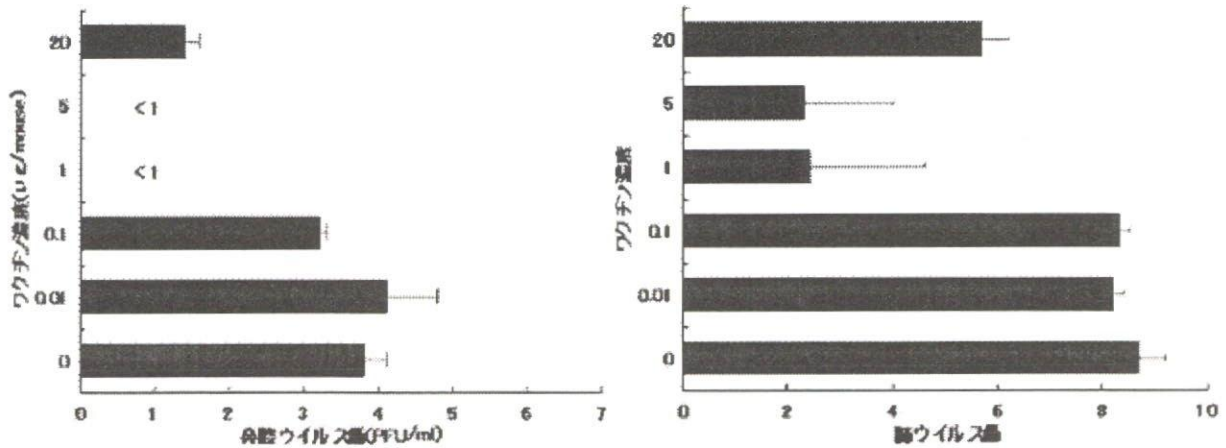


Figure 2 PR8ワクチンの経鼻接種によるA/P交叉感染阻止能

がら、血中の交叉IgG抗体の誘導は乏しいことから、下気道における部分的な感染はこれに起因していることが示唆される。A/G および B/I を感染させた場合には、1回および2回ワクチンを接種した群ともに部分的な防御が認められたものの、ワクチンの量に依存的な交叉防御効果の増強は認められなかった。しかしながら上気道には大量の交叉IgA抗体の誘導は認められていた。このことは、ここで誘導された交叉IgA抗体は、防御抗体としての機能は乏しいことが示唆される。

#### f. ヒト scFv ライブラリーの作製 (橋口、山口)

通常の採血手法によって約5mlの採血を行い、比重遠心によって分離したところおよそ  $2 \times 10^7$  個のPBMCを採取することができた。採取されたリンパ球からのmRNAの分離にはTryzol、2-プロパノール、エタノール等を用いて行いた。その結果、定量は行わなかったがmRNAが採取されたとしてcDNA化を進めた。回収されたmRNAのcDNA化にはPromega社のImProm-II Reverse Transcription Systemを使用した。cDNA化後、確認のため $\beta$ -actinのプライマーを用いたPCRを行い、バンドの確認ができた。これを用いて今後のヒトscFvライブラリーの作製を進める。

#### D. 考察

本研究計画の最終目標は「あらゆるヒトインフルエンザに対して治療可能なscFvを作製する」である。この目標ではヒトに応用できる生物製剤としてのscFvの作製が必須であるが、その前段階として、

実験動物レベルでの効果の評価が必要となる。そのためヒトscFvの作製と同時に、マウスscFvライブラリーの作製とインフルエンザ結合型ファージ抗体の作製、さらには作製されたscFvの生体における効果の評価を行なうための動物実験系の確立を行った。

scFvを作製する工程として、VHおよびVL遺伝子をPCRによって増幅し、その両者をリンカーで結合させVH-LINKER-VLにするassembly-PCRを行なう。昨年度、マウス脾細胞由来および抗PR8ハイブリドーマ由来のcDNAを用いて行なった結果、assembly-PCRによる増殖が認められなかった。そのため本年度、assembly-PCRに使用するプライマーの再設計を行なった(浅沼)。その結果、およそ700bp付近にバンドが認められたため、引き続き制限酵素Sfi1およびNot1で処理し、pCANTAB5Eファージミドベクターに挿入、トランスフォーム後、ヘルパーファージを用い、コロニーの形成を確認した。最終的に8クローン中5クローンにインサートが確認された。この5クローンについてPR8コートプレートを用いてELISAを行なった結果、1クローンにのみ高い結合性が認められたが、ブロッキングバッファーを変更した場合には結合性が認められなかった。このことはインサートの存在とscFvの発現は相関しない、もしくは発現されている場合にも、著しく結合力が低下していることを示唆している。また遺伝子の増幅、結合、制限酵素処理およびライゲーションの過程における遺伝子の変異も疑われる。そのためこれらについてシークエンスを行なったと

ころ、正常であることが確認されている。続いてこれら5クローンについてウエスタンブロットを行い scFv の発現を確認したところ、scFv の発現は認められていた。これらの結果から、陽性標準としてハイブリドーマを用いた scFv を作製したにも関わらず、その結合性は著しく低下することが示唆された。より結合力の高い scFv を獲得するためには、より多くのハイブリドーマクローンをを用いるか、より分子量の大きい分子構造にする必要がある。そのため今年度、scFv に CH1 および CL を付加させた Fab 分子に着目し、ファージディスプレイ法により作製されたヒト Fab ライブラリーから抗インフルエンザ Fab を作製する実験を新たに加えた (山口)。これによりファージディスプレイ法そのものの有用性と完全な抗体分子と scFv の中間的な存在である Fab がどの程度の抗原結合力を持つのかを明らかにできる。このことは今後の scFv 作製の指針ともなる重要な実験である。本研究では最終的に4つの Fab クローンを獲得し、これらについて PR8 との結合性を検討した結果、全ての Fab クローンは HA 分子の立体構造を認識していることが明らかとなった。そのため、これら全てが防御抗体として機能することが予想されたが、細胞に対する感染阻止実験の結果、1つの Fab クローンにのみ感染阻止能が認めれるにすぎなかった。このことは、他の3つの Fab クローンは著しく結合力が低いため感染阻止能が認められない、もしくは立体構造のシアル酸結合部位とは異なる部位を認識していることが示唆される。このことは先に示した scFv の結果と相関する。すなわち、ハイブリドーマより作製された scFv の抗原との結合力は ELISA で検出ができない程度までに著しく低下しているが、Fab にすることにより ELISA で検出可能な結合力を有するが、感染を阻止する結合力は有さない。このことは CH1 および CL 分子の付加により部分的な結合力の増強が期待できることも示唆している。一方、感染阻止能を有する Fab クローンは抗原型が異なり本研究によって作製されたマウス馴化 A/P 株に対する感染阻止能も部分的に有していた。しかし、A/Y に対する感染阻止能は認められなかった。このことから、Fab クローンによっては多

くの異なる抗原型のインフルエンザと反応することが可能で、かつ感染阻止能を有するものが得られる可能性がある。

ヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化は抗 scFv の評価、特に複数のウイルス株に対して反応性を示すクローンを獲得し、それらの有効性を実験動物を用いて評価するのに必要となる。昨年 A/P 株の馴化に成功し、A/F および A/B 株についてはマウスでの継代は終了していた。今年度、引き続き A/S および B/N の馴化と馴化前後の抗原性の相同性について検討した (浅沼)。その結果、A/S においてはマウスでの継代が初期段階で困難であったが、発育鶏卵を繰り返し用いることによって、マウス体内での増殖可能な株を大量に獲得することができた。また、B/N 株についても初期段階で発育鶏卵を継代に用いる必要性があったが、その後はマウスの体内で順調に継代することができた。このようにして作製された馴化株は、初期に用いたヒト株と抗原性が変化する可能性があるが、マウスにこれら馴化株を微量感染させ、続いて初期株の致死感染を行った結果、完全な感染阻止が認められた。このことから馴化後も抗原性には変化がないことが示唆される。また、馴化された A/S については50%致死量の検討も行い、ヒト株よりもマウスに対する高い致死性を獲得していた。このように作製された馴化株が交叉防御効果の実験に使用可能かどうかを検討するために、馴化株の中で A/P 株を用いた感染実験を行なった。PR8 ワクチンを経鼻接種したマウスに様々なウイルス株を感染させ防御効果を検討したところ、PR8、A/P、A/Y、A/G、B/I の順で特異および交叉防御効果が認められた。このことから本研究で馴化された A/P 株は、同じ H1N1 亜型の A/Y 株よりも PR8 に対する交叉性が高いことが示唆された。今後、これらの馴化ウイルス株を用いることで、交叉防御効果の判定が可能となった。

#### E. 結論

今年度は抗インフルエンザヒト scFv の選別、抗インフルエンザ抗体ハイブリドーマ由来 scFv の作製、抗インフルエンザ Fab の作製、交叉防御効果検



討のためのヒトウイルス株のマウスへの馴化、さらにそれを用いたマウスにおける交叉感染実験系の確立が同時に進んでいる。scFv の選別は多くの問題点を抱えながら進んでおり、特に結合力の低下を解決する手法、もしくはより結合力の強いクローンの選択が必要とされる。ハイブリドーマ由来の scFv の作製には成功したものの、こちらも著しく結合性が低下している。これらを解決するには多くのハイブリドーマクローンが必要となる。抗インフルエンザ Fab では有効なクローンが見つかり、現在さらなる検討を進めているが、scFv 同様完全な抗体分子よりも結合性は低下している。この後、このことが感染阻止にどれほど影響を与えるかは検討課題である。ヒト株のマウスへの馴化は H1N1 で 3 株、H3N2 で 1 株、B 型で 1 株終了した。またこの中で A/P 株を感染実験に用いることも可能であった。今後の scFv の評価にこれらが有用である。

#### F. 研究発表

2005 年度日本ワクチン学会学術集会 2005 年 10 月 大阪（浅沼）

2005 年度日本ウイルス学会学術集会 2005 年 11 月 横浜（浅沼）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



---

平成17年度

創業等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31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