

目指している。人工ヒト抗体療法は、重症化予防や治療目的で使用されているγグロブリン製剤の効果を保ちつつ、血液製剤では払拭することが出来ない未知の感染性病原体混入の危険性を取り除き、安全性を向上させる方法として大いに期待される。

本研究では、HCMV 抗体陽性健康成人の成分血をもとに作製されたヒト抗体ライブラリーから HCMV 親和性抗体を単離し、それらの中和活性を含めた機能解析を行なった。はじめに、HCMV の中和抗原の一つ glycoprotein B(gB) の組換えタンパクに強い結合活性を示すクローンを複数単離し、それらのエピトープを分類した。ここまでの実験は、抗体の抗原結合部位 Fab 部分の融合タンパクによる解析であったが、今期から、各クローンの Fab を有する完全ヒト抗体 (IgG₁ 型抗体) を作製し、それらを用いて詳細な機能解析を行なった。

B. 研究方法

血清が HCMV 中和活性を有する小児科医のボランティア 1 名から採取した B リンパ球を用いて、抗体の Fab 部分を繊維状ファージに提示させたファージ抗体ライブラリーを作製した (黒澤ら、未発表)。このライブラリーを用いて、異なる 2 種の抗原 (a: HCMV envelope 構成タンパク gB の膜外領域 gB654、b: HCMV virion) に親和性を示す抗体クローンをそれぞれ生物学的に濃縮 (パニング) した。抗原に親和性を示したクローンについて、はじめに V_H および V_L の塩基配列を決定して分類した。つぎに各分類グループ代表クローンの Fab 抗体を用いて、gB654 に対する各クローンの結合力 (K_D) および抗体間の結合における競合関係について、Biacore3000 (Biacore 社) を用いて調べた。

gB654 に結合活性を示した Fab 抗体は、いずれも中和活性を示さなかった。しかし、これらの抗体が IgG 抗体で中和活性を示す可能性を検討するため、3 クローン (H05, H08, H14) の IgG₁ 型抗体を作製した。本抗体は、3 クローンの Fab 遺伝子部分を、遺伝子組み換え操作によ

って、ヒト IgG₁ 抗体発現ベクターに搭載し作製した ((株)抗体研究所)。中和活性測定法は従来の plaque 法で行なった。具体的には、段階希釈した抗体液と HCMV cell-free 液を混合して 1 時間静置した後、ヒト胎児由来の繊維芽細胞 (MRC-5 細胞) に感染させ、約 1 週間後に plaque 数をカウントした。

C. 研究結果

1) 抗 HCMV 抗体クローンの単離

HCMV を中和する抗体を単離するため、2 種の抗原 (a: HCMV envelope 構成タンパク gB の膜外領域 gB654、b: HCMV virion) を用いて別々に抗体ライブラリーをスクリーニングした結果、HCMV virion (精製ウイルス粒子) を用いたスクリーニングでは 27 クローン、gB654 を用いたスクリーニングから 80 クローンを単離した。計 107 クローンの V_H および V_L 領域の抗体遺伝子配列を決定し、特に V_H のアミノ酸配列によって 14 種 (H01~H14) に分類した (表 1)。

表 1. 単離クローン数とスクリーニング

VH	Isolated clones	
	screening(a)	screening(b)
H01	4	0
H02	6	3
H03	31	8
H04	7	4
H05	14	0
H06	1	0
H07	1	0
H08	11	3
H09	3	0
H10	2	0
H11	0	1
H12	0	1
H13	0	2
H14	0	5
sum	80	27

※(a)は gB654 スクリーニング、(b)は HCMV virion スクリーニングで単離されたことを示す。

14種の抗体クローンはELISA法でいずれも抗gB654結合活性を示した。そのうち7種(H02, H03, H04, H05, H08, H09, H14)について、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を利用した反応速度論的解析を行なった結果、いずれも強い結合力($K_D=9.3-0.53$ (nM))を示した (表 2)。

表 2. gB654 に対する抗原親和力

VH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
H02	8.1×10^5	4.7×10^{-4}	0.58
H03	1.3×10^5	1.0×10^{-3}	8.5
H04	7.9×10^4	3.7×10^{-4}	4.7
H05	8.2×10^5	7.6×10^{-4}	9.3
H08	2.5×10^5	1.8×10^{-4}	0.73
H09	8.9×10^4	5.7×10^{-4}	6.5
H14	1.2×10^6	6.5×10^{-4}	0.53

強い結合力を示した7種のクローンが認識するgB654分子上のエピトープを簡便に分類するため、SPR法で任意の2抗体の競合実験を行なった。具体的には、あらかじめ一方の抗体を抗原gB654に結合させた状態でもう一方の抗体を加え、先の抗体の結合が後に加えた抗体の結合に影響を与えないか、あるいは阻害するかを解析した。図1a)に示すように、H05とH09、H05とH14の組み合わせでは互いの結合が他の結合を阻害せず、それぞれ異なるエピトープを認識していることが示唆された。しかし、図1b)に示すように、H03は他のいずれの抗体の結合も阻害した。同様に全ての組み合わせで実験を行なった結果、7種の抗体は3グループ(a:H05, b:H09, H14, c:H02, H03, H04, H08)に分類された。

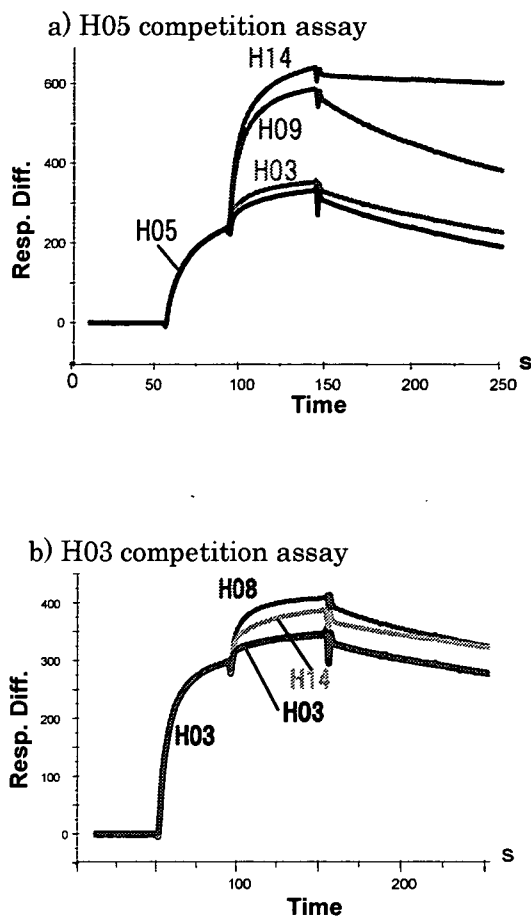
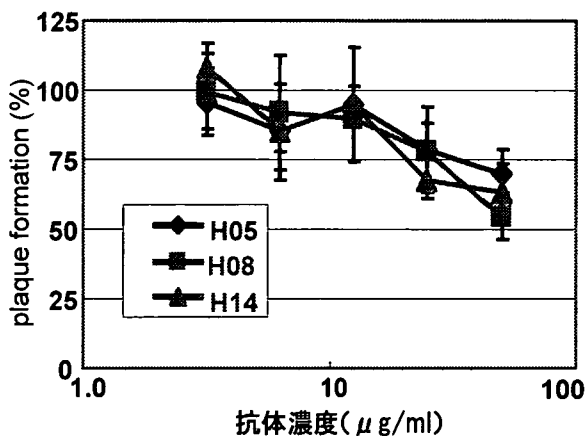


図 1. エピトープ解析の結果 (SPR 法競合実験)

3) in vitro 中和活性解析

本研究で得られた14種の抗体は、Fabが1価のFab-cp3型あるいはFab-PP型抗体では中和活性を示さなかった。そこで、3種(H05, H08, H14)のクローンについて遺伝子組換え操作によりIgG1型抗体を作製し、中和活性を評価した。その結果、3種はいずれも50μg/mlで50%のプラーク抑制効果を示す、弱い中和活性を示した (図 2)。現在、3種(H05, H08, H14)に加えてさらに4種(H02, H03, H04, H09)のIgG抗体作製を進めており、早急に中和活性を評価する。また、補体依存性および臨床分離株への応答も同時に検討する。



中図2. 中和活性評価の結果

D. 考察

今回解析した3種(H05, H08, H14)のIgG抗体は、gB654に対する結合力が非常に強いにもかかわらず、弱い中和活性を示すにとどまった。今後は、3種の抗体の中和活性における補体要

求性の検討および種々の臨床株への応答性も検討する予定である。また、3種以外のクローンについてもIgG化を進めており、これらの中和活性も評価する。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

11th International Cytomegalovirus and beta herpesvirus Workshop (Toulouse, France)にて発表

第55回日本ウイルス学会(札幌)にて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
.K.Suzuki, Y.Akahori, Y.Asano, Y.Kurosawa & K.Shiraki:	Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies for Varicella-Zoster virus and the effects of light chains on the neutralizing activity	<i>J. Med. Virol.</i>	79	852-862	2007
G. Kurosawa et al. (30 authors)	Comprehensive screening for antigens expressed on carcinomas via isolation of human monoclonal antibodies that may be therapeutic	<i>Proc Natl Acad. Sci USA</i>		in press	2008