

200808006A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業

治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究

課題番号 H 18 —創薬— 一般— 024

平成 2 0 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒澤 良和

平成 2 1 (2 0 0 9) 年 3 月

目 次

| | | |
|--|------|----|
| I. 総括研究報告 | | |
| 治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究 | 黒澤良和 | 1 |
| II. 分担研究報告 | | |
| 1. インフルエンザワクチン株を用いたヒトモノクローン抗体の性状解析に関する研究 | 奥野良信 | 9 |
| 2. 抗VZV治療用ヒト抗体の臨床試験に関する研究 | 白木公康 | 13 |
| 3. 治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究に関する研究 (抗サイトメガロウイルスヒト抗体を対象として) | 浅野喜造 | 17 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | | 21 |

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)
総括研究報告書

治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究

主任研究者 黒澤良和
藤田保健衛生大学総合医科学研究所・教授

研究要旨

本プロジェクトは、「感染症を中心とする各種疾患に役立つヒトモノクローン抗体開発」を目的とする厚生労働科学研究費補助金事業として実施されている。第Ⅰ期（平成 9・11 年度）においては、ファージディスプレイ系を用いた巨大ヒト抗体ライブラリー作製技術の導入、様々な抗原に対する各種スクリーニング法の確立に成功した。第Ⅱ期（平成 12・14 年度）には、VZV、インフルエンザウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素に対する中和抗体単離に成功した。第Ⅲ期（平成 15・17 年度）には、特定の性質をした抗体を血清中に有するヒトの血液（apheresis による大量のBリンパ球の採取）から、その抗体をモノクローン化する技術開発に成功し、インフルエンザウイルス、及びハブ毒中和抗体の研究に集中した。第Ⅳ期（平成 18・20 年度）では、インフルエンザウイルス、VZV、サイトメガロウイルスを対象として、治療薬としてヒトモノクローン抗体製剤化を具体的に実現することを目指した。平成 20 年度は、12 年間に渡る長期プロジェクトの最終年度に当たった。

VZV に対しては、gH 分子に結合するヒトモノクローン抗体を 9 種類単離し、その中から強力な中和活性を示すクローンを 2 種類同定しており、それをいかに製剤化するかが問題であった。これらの抗体は、ウイルス感染阻止効果、syncytia 形成を通じた感染細胞拡大反応の阻止効果、ADCC 反応による感染細胞殺傷効果を示すことが判明している。更に昨年度の研究によりモルモットを用いた感染モデル動物系で抗体投与によりウイルス増殖を阻止できることが示された。本年度には、in vitro で培養細胞にウイルス感染後抗体を投与すると、感染細胞はウイルスゲノムを保持したまま正常細胞と同じ形態に戻ることが示され、VZV の潜伏感染モデル作製に成功したことを示唆する結果を得た。今後 SCIDHu マウスを用いた擬似ヒト VZV 感染モデル系を用いて抗体の in vivo における抗ウイルス効果を確認した後、臨床試験実施に向かう。

サイトメガロウイルスに対しては、gB 分子に結合する 10 種類のヒト

モノクローン抗体を単離しており、そのうち IgG 分子として調製した 3 種類の抗体が、補体存在下で強いウイルス中和活性を示すことが判明していた。今回更にウイルスを細胞に感染したのち抗体を投与すると、その細胞から産生されるウイルス粒子が激減することが判明した。その機構は今後解明する必要があるが、この事実は単離した抗体の中に治療用抗体として十分な性質を持つものが含まれることを示唆していると解釈できる。すでに単離した 10 種類のクローンすべての IgG 化は終了しており、もっとも強力な中和抗体クローンを同定した後、臨床試験を実施する。

昨年度までに、H3N2 型インフルエンザウイルスに対するヒト体内に存在する中和抗体レパトリーの詳細な解析(モノクローン抗体レベルの解析であることが新しい)が、一人のドナーについては終了していた(本研究では 3 名の小児科医が献血に協力している)。得られた結果を論文にまとめて雑誌に投稿したが、我々の得た結果はインフルエンザウイルス研究者の常識とかなり異なる内容を含むためか、様々な批判を受けて本年度はその対応に追われた。我々は基本的にヘマグルチニン(HA)に対する抗体を解析したつもりだがその根拠を問われた(なぜ抗 HA 抗体であると言えるのか等)。これについては、ウエスタンブロットの系を立ち上げて我々の得た結果が正しいことの証拠を得た。数多く含まれる抗 NP 抗体による障害は、新しくイーストディスプレイ系を導入し、そのシステムで HA1 分子を発現し、変異を導入した抗原に対する抗体の反応を容易に解析することが出来るようになり、また今までとは別の形でのライブラリーのスクリーニングが可能となった。すでに単離したヒトモノクローン抗体群のなかには、すべての H3N2 型ウイルスを中和できるクローンが含まれているが、それを抗ウイルス薬として開発する準備を進めている。また本年度新たに H1N1 型抗体に対する中和抗体についても数多く単離しその性質を調べた。

本プロジェクトでは、すでに様々なウイルス(VZV、ロタウイルス、サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス)及び細菌毒素(ジフテリア、破傷風菌、ボツリヌス)、蛇毒(ハブ)に対して治療薬として十分な性質を示すヒトモノクローン抗体の単離に成功している。創薬を実現するには、特許問題の解決と製薬企業の参入による臨床試験の実施が欠かせない。本年度は、そのための努力も精力的に行った。

分担研究者

奥野良信・(財)阪大微生物学研究所・所長

白木公康・富山大学医学部・教授

浅野喜造・藤田保健衛生大学医学部・教授

A. 研究目的

抗体は、本来生体内でウイルスや病原菌に対する最も強力な生体防御分子として機能しており、それを薬剤として用いることは当然可能であると予想される。しかしながら、現在市販されている感染症に対する治療用モノクローン抗体は、RSV(respiratory syncytial virus)に対するシナジス (palivizumab, MedImmune 社製) のみである。インフルエンザウイルスに対しては、毎年のように antigenic drift と呼ばれる抗原性の変異が起こることが治療用抗体開発にとって大きな障壁となっている (開発している間に、中和可能な抗原の性質が変化する可能性が高い)。そこで antigenic drift の影響を受けにくい中和エпитープに結合してウイルスを中和する抗体の開発が望まれる。VZV の場合は、ウイルスを中和する抗体価の高い抗血清から調製されたγグロブリン製剤(VZIG)が市販されていたが、最近発売中止となった。しかし、このことは抗体投与による治療効果があることを示しており、中和活性を示すモノクローン抗体を治療薬として開発できる可能性が高い。サイトメガロウイルスについては、過去において中和抗体を治療薬として開発を試みたグループがあるが途中で断念したという経緯がある。

抗体を治療薬として使用することは、様々な毒素 (ジフテリア毒素等) に対する馬抗血清を用いて調製された“特効薬”としての長い歴史がある。しかし馬抗血清については、異種動物由来であることに基づく血清病の発症の危険を常に伴い、その心配の無いまったく新しい抗体治療薬の開発が求められている。1975年に細胞融合を用いてモノクローン抗体を作製する技術が開発されて以降、マウス/ヒトキメラ抗体作製技

術、ヒト化抗体作製技術、ヒト抗体産生トランスジェニックマウス作製、ファージ抗体ライブラリー作製と様々な技術開発が進み、治療用モノクローン抗体が次々と開発されると予想されたが、成功例は予想外に少ない。様々な要因が考えられるが、各主要技術にはそれぞれ基本特許が存在し高額のライセンス料が設定されており、多くの研究者 (製薬企業を含めて) がこれらの研究技術を使用することに二の足を踏むとか、タンパク質が薬であるために製造コストが高く、よほど大きな市場が期待できる疾患に対する治療薬しか開発対象とならないとか、学問的もしくは技術的要因以外の理由で、“抗体創薬分野は激烈な競争が行われている”という一般に流布されている印象とは異なり、多くのグループが限られた分野 (具体的には、癌とアレルギー) で開発競争をしているのが実状である。本プロジェクトはそのような状況を打破して、各種感染症に対する治療用抗体開発の成功例を作り出そうという試みでもある。

B. 研究方法

本研究プロジェクトでは、まず (1) ヒト (献血ボランティア) からBリンパ細胞を採取し、mRNA を抽出したあと抗体ライブラリーを作製する。(2) 中和エпитープを有する標的分子を抗原にして抗体ライブラリーをスクリーニングして多数のモノクローン抗体を単離する。(3) それぞれの抗体クローンについてウイルス中和活性を測定する。抗原への結合力、ウイルス中和力を測定する。異なるクローンがどのようなエпитープを認識するかを解析する。抗体のウイルスへの作用、ウイルス感染細胞への作用を、最初は *in vitro* で、続いて

ウイルス感染モデル動物系を用いて解析する。

(4) 以上の結果に基づき、もっとも治療薬にふさわしいヒトモノクローン抗体を選んで臨床試験を実施する。このプロセスを対象疾患ごとにたどることが、創薬に至る基本戦略である。

VZV に対する抗体の場合は、モノクローン抗体の単離、治療用抗体候補の選別はすでに終了しており、水痘帯状疱疹患者のどの段階の治療もしくは予防薬として使用するかについて、実験結果を得て臨床試験開始の根拠とするかが、本年度は問われる段階にあった。小児期に発症する水痘の多くは軽症であり、一方、帯状疱疹は重症化することも多く、さらに予防が可能となるとその価値は高くなる。

サイトメガロウイルスに関しては、臓器移植に際しての免疫抑制剤使用時等、免疫力が低下した段階で深刻化することが問題となっている疾患である。そのような状況下で中和抗体がどのような抗ウイルス効果を示すかを検証することが、抗体治療薬として開発可能かを判断する上で重要要件となる。

インフルエンザは毎年数多くのヒトが感染・発症し、高齢者の場合は死者を出す例も頻繁に起こっており、もしかなり安価な治療薬（他の治療法と比較して患者が選択肢と考える範囲の額）として抗体が開発されれば、そのニーズは間違いなく高い。さらに現在、高病原性 H5N1 型トリインフルエンザウイルスが深刻な問題となり、それがいつヒトからヒトへ感染する新型ウイルスとなってパンデミックを引き起こすかが人類全体に深刻な問題として脅威を与えている。このような状況に対して、もしインフルエンザウイルスを中和するヒトモノクローン抗体を開発できるとすれば、それは

治療、予防、感染拡大阻止、様々なレベルのどこを標的として使用することが適当であり、そのためには抗体にどのような性質を求めるべきかから考慮される必要がある。我々の場合、すでに単離した抗 H3N2 型ウイルス中和抗体の中に実に様々な性質の抗体が含まれることが判明しており、その詳細な解析から、方針を見出せるはずだという観点から研究を進めた。

C. 研究結果

VZV に対して

日本人の場合、ほとんどのヒトは幼児期に VZV に感染して発症（もしくは不顕性感染）し、抵抗力（中和抗体及び細胞性免疫力）を獲得するが、ウイルス自身は体内で死滅することなく長期間にわたって潜伏する。最近は、幼児に対するワクチン（Oka 株）接種が広範囲に実施されており、免疫力のみを獲得したヒトの割合も高くなっている。成人になってある条件が整うと帯状疱疹が発症することがあるが、こちらはしばしば重篤化する。本年度得た結果では、*in vitro* で培養した細胞にウイルスを感染させ 2 時間以内に中和抗体を投与し細胞培養を継続すると、ウイルス感染後一度起こる細胞の形態変化がやがて正常な形態へ戻ることが示された。そのようなウイルス感染細胞はウイルスゲノム DNA を保持しており、これが上記した *in vivo* での潜伏感染をどの程度反映した現象であるかが今後解析すべき重要な課題である。すでに単離選別した 2 種類の強いウイルス中和活性を示すヒトモノクローン抗体の臨床試験開始に関しては、ここで観察した現象の評価、及び現在計画している SCIDHu マウスを用いた擬似ヒト VZV 感染モデル動物系を用いた抗体の *in vivo* にお

ける抗ウイルス効果の結果次第であると考えている。

サイトメガロウイルスに対して

サイトメガロウイルスに対する中和抗体は、強い中和活性を示す抗体価の高い血清を持つ小児科医より **apheresis** で大量のBリンパ球を採取して作製した抗体ライブラリーより単離した抗体であり、最初からそれらの抗体が中和活性を示すことを期待していた。結果として中和活性には補体の共存が必要であったが、これは **gB** 分子に対する抗体であったことと関係すると考えられる。抗体を治療薬として使うとすれば、血液中に補体が存在する状態であるためにこのこと自体に問題はない。治療薬として使用する際には、発症した時点でウイルスはすでに細胞に感染しているはずである。本年度、抗サイトメガロウイルス中和抗体が感染段階のみならず、すでに感染した細胞へ対してもウイルス産生能力を激減させる結果を得たことは、今後本抗体を用いて治療薬として開発する上で重要な根拠を得たことになるかと判断している。そこでその作用機構の解明が次の解決すべき課題として必要となる。

インフルエンザウイルスに対して

インフルエンザウイルスに関しては、すでに多くの研究者により数多くの優れた論文が発表されている。インフルエンザウイルスの場合は、細胞性免疫より中和抗体の存在（液性免疫）が感染後に発症の有無を決定する因子として、さらに治癒過程でもより重要な役割を果たす生体防御機構であると考えられている。そのためウイルス感染後、もしくはワクチン接種後ヒト体内でどのようなウイルス

中和抗体の産生誘導が起こるかについて詳細な研究が存在する。ところがその多くは抗血清（ポリクローン状態）を用いられて行われた研究であり、モノクローン抗体レベルの研究は全て、マウスで行われたものである。すでに確立している”常識”によれば、「ウイルス感染（もしくはワクチン接種）により発症しても、ウイルスを中和できる抗体を産生するBリンパ細胞が出現して治癒する。そのBリンパ細胞の一部は記憶細胞化して、再度のウイルス感染に備える。しかしインフルエンザウイルスの場合は、そのゲノム配列を高頻度に変化させる能力（突然変異の導入）に優れており、中和抗体との戦いに勝利したウイルス株（既存の中和抗体により殺されない能力を獲得した変異株）が翌年に出現する。これが **antigenic drift** の原因である。」この常識に対して我々が得た結果は様々な疑問を投げかけている。我々の研究では、まずインフルエンザウイルスに毎年頻繁にさらされると期待出来る小児科医から **apheresis** により大量のBリンパ球を取得し、巨大抗体ライブラリーを作製した。そして1968年から2004にかけて使用されたワクチン株12種類を抗原にしてスクリーニングし、得られた抗HAモノクローン抗体すべてについてその中和活性についての株特異性を体系的に解析した。その結果、「100種類を超える中和抗体クローンは次の3種類に大別された。1968年株から1973年株を中和するクローン、1977年株から1993年株を中和するクローン、1997年株から2003年株を中和するクローンである。」この事実は、体の中で作られた中和活性を示す抗体の株特異性が予想外にワイドであること、さらに毎年のように少しずつ変異を獲得して侵入してくる変異株に対して、大抵の年には、

既存の抗体で十分に対応できており、結果として新しい性質のクローンが誕生しなかった可能性を示す。更に我々は、もうひとつ重要な観察を得た。採血したのは2004年6月である。その前(2003年秋から2004年春にかけて)に流行した株(2003年株)とその翌年(2004年秋)に出現した株(2004年株)に結合する多数のモノクローン抗体を得ることにより、感染後にどのような抗体産生が起こっているかを解析できるはずであった。さらに我々は、同一人物から2007年4月にも血液採取を実施し、同様の解析をした。そこから得られた観察をまとめれば、「ウイルス感染により、ウイルスに結合する抗体が新しく多数出現するがその多くは中和できない(正確には中和力は検出感度以下である)。中和活性を示す抗体は、ほとんどすべてその前から記憶細胞として存在した抗体産生細胞により作られる抗体と判断された」。このことは、強いウイルス中和活性を示す抗体が新しく作られるのは時間のかかるプロセスであり、侵入したウイルスに対してを既存抗体が中和できる間はそれが生体防御の役割を担い、新しく出現した抗体は生体防御の役割を果たすことなく消えてゆくかもしれないことを示唆している。我々は論文の中でこのように結論したが、証拠に基づかない **too much speculation** という強烈な批判を浴びた。そして我々がこのような結果を得たのは、我々の研究戦略ではヒト体内の抗体レパートリーのほんの一部を解析して全体像を見ていないためであろうという批判を受けた。

私(黒澤)の見解では、(1) マウスを免疫して得る(この場合、最初免疫する時点で、マウスは抗原に対してナイーブであり、また免疫はワクチンを使って行われる)結果は、

少しずつ変異し続けるウイルスが毎年のように感染するインフルエンザウイルスに対してヒト体内で起こる免疫現象と非常に異なっているにしてもなんら不思議なことではない。(2) 我々の得た結果は、ポリクローン抗体の状態で解析する限り決して得られない。この二点において、我々はそれだけユニークな仕事をしていることを反映しており、逆に叱咤激励されているという印象をもっている。もちろん、一つ一つの批判に完全に答えられる研究を考案しつつ研究を進めて、最後には受け入れられる必要があるが。

H3N2型ウイルス全てを中和できるヒトモノクローン抗体の単離成功を含めて、このような研究戦略を採らない限り決して単離できなかった結果であり、今後我々の研究の正しさを時間はかかるが証明し続けなければならない。

D. 考察

本プロジェクトは、すでに開始以来12年を費やした。様々な病原性ウイルス、または病原菌が産生する毒素に対して、それらを中和する活性を示すヒトモノクローン抗体をいかにして単離調製するかという学問的かつ技術的課題については、ほぼ完璧に解決する方法を確立し我々の研究グループは、比較的短時間で目標を達成する技術水準に到達している。これには但し書きが必要で、「ただし感染が起こったとき人間が通常すでに確立された免疫機構で対処できる対象であること」という条件付きである。例えば、エイズウイルスについては、ヒトの免疫機構では歯が立たない。C型肝炎ウイルスに対してもほぼお手挙げである。結核菌について、およびマラリアについてもしかり。この人類に対する4大疾患に

対しては、今のところ抗体治療薬は、まったく展望が開けていない。

このように、4 大疾患を除く感染症に対しては、治療用抗体単離調製が可能になったといっても、実体としては RSV に対するシナジスだけが商品化された例しかない。このギャップについて、ここでは主として、何が欠けており、今後いかにすれば治療用抗体の開発が可能になるかを議論する。第 IV 期目の課題名は、「治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究」であった。

特許問題

ファージ抗体ライブラリー技術がその革新性の高さに比較して、それほど広く使われていない理由は、その利用に必須な基本技術、RT-PCR による抗体 V 領域遺伝子の増幅、さらに増幅した V 遺伝子をファージディスプレイ系を用いてランブラリー化することについて、WinterII 特許および McCafferty 特許という基本特許が存在しそのライセンス料が高額に設定されていることも原因のひとつである。消極的解決策ではあるが、この技術開発以降（それぞれ 1989 年、1991 年に特許申請される）まもなく 20 年経過するため特許の効力は失われる。

市場性

「抗体医薬はタンパク質であるために、薬価が高く設定されるために、癌のような“死に至る病”でない患者が使わないために市場性に乏しい。臨床試験を実施するには多額の資金が必要であり、小さな市場しか望めない疾患に対する薬は製薬会社は臨床試験を実施しながらない」とよく言われる。これは同じ次元の問題であり、何故創

薬にそれほど莫大な費用がかかるかである。現在、1 種類の薬の開発に平均 1300 億円かかるといわれている。これは世界中の製薬会社が薬の開発に費やしている研究費総額から割り出されている値であり、我々のように厚生労働省研究費に支えられて開発研究を実施してきた立場からは、まったく異なる算定基準を考案する必要がある。上市するには所定の臨床試験の過程（前臨床—臨床試験フェーズ 1、フェーズ 2、フェーズ 3）を最終的には経る必要があるが、その際、費用が最小限で済み、成功確率の高い道を開拓する必要がある。我々のような研究戦略をとると、単離した抗体は明らかにドナーの体内で生体防御の役割を果たしていた抗体そのものであり、その意味で副作用を起こす確率は低い。また臨床試験に際して、まずは患者の了解の下に医者主導の臨床研究として予備的臨床から開始することもありうる。このような場合、GMP レベルで数百グラムオーダーの抗体を調製するだけの費用なら、それほど多額の費用は必要ではない。今後様々な工夫をしながら、成功例を作り繰り出すことに全力を挙げる。

E. 結論

VZV, サイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス全ての例で、学問的及び技術的レベルでは、治療用ヒトモノクローン抗体開発に必要なほとんど全ての問題を解決している。今後、いかに臨床試験を開始するかが最大の問題であり、まずは医師主導で臨床研究を行うべく、そのためにも最低必要な GMP レベルでの抗体調製それを用いた前臨床試験としての大型動物を用いた安全性試験から開始する必要がある。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Y. Akahori, G. Kurosawa, M. Sumitomo, M. Morita, C. Muramatsu, K. Eguchi, M. Tanaka, K. Suzuki, M. Sugiura, Y. Iba, A. Sugioka and Y. Kurosawa: Isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent (ICOS) method. BBRC. 378, 832-835 (2009)
2. Y. Akahori, K. Suzuki, T. Daikoku, M. Iwai, Y. Yoshida, Y. Asano, Y. Kurosawa and K. Shiraki: Characterization of neutralizing epitopes of Varicella-Zoster virus glycoprotein H. J. Virol. 83, 2020-2024 (2009).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)
分担研究報告書

インフルエンザワクチン株を用いたヒトモノクローン抗体の性状解析

分担研究者： 奥野良信 財団法人 阪大微研研究会 観音寺研究所
研究協力者： 額綱律子 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野

研究要旨

小児科医より成分採血で得られたリンパ球を材料に作製された Y 抗体ライブラリーから年代別に選択した 12 種類の A 香港型 (AH3) のインフルエンザワクチン株を抗原として得られた多数のヒト Fab 抗体のうち、1977～1993 年までの様々な年代のワクチン株に対して HI 活性は示さずに中和活性を示した数クローンについて完全型 IgG 抗体に変換し、A/Yamanashi/2/77 株に対する中和活性を測定した。これらのクローンの Fab 抗体と IgG 抗体の HI 活性と中和活性の結果から、抗体分子の大きさが中和活性に影響を及ぼしていることが示唆された。また、これらの抗体に対するエスケープ変異が出現し難いという結果から、これらの抗体が認識するエピトープが重要な部位であることが示唆された。この研究成果は、将来のインフルエンザワクチンの改良、開発およびインフルエンザ治療薬の開発に有用な情報を提供するものと期待される。

A. 研究目的

小児科医より成分採血で得られたリンパ球を材料に作製された Y 抗体ライブラリーから H3N2 ワクチン株を抗原として得られた多数のヒト Fab 抗体のうち、1977～1993 年までの様々な年代のワクチン株に対して HI 活性は示さずに中和活性を示したクローンがいくつか存在していた。これら抗体について完全型 IgG に変換して HI 活性や中和活性を測定し、ヒト体内で作られる中和抗体の性状をモノクローンレベルで解析した。

B. 研究方法

1. ウイルス

完全型 IgG に変換された抗体の性状を解析するため、過去の H3N2 ワクチン株 A/Yamanashi/2/77 株(以下 Yam/77 と略す)を MDCK 細胞で増殖させたウイルスを HI 活性および中和活性測定に用いた。

2. 中和試験

フォーカス減少を指標としたマイクロ中和抗体価測定法 (Okuno, Y., et al. J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313, 1990) により実施した。

階段希釈した完全型IgG抗体とワクチン株のウイルスを1:1で混合し、37°Cで1時間反応させて中和した。この反応液をMDCK細胞に感染させ、中和から逃れた残存ウイルスで形成されるフォーカスをPAP法で染色し、フォーカス減少率を求めた。Fab抗体は、100 µg/mLに希釈した抗体を用いて同様に中和試験を実施した。

3. 赤血球凝集阻止 (HI) 試験

HI試験はマイクロプレートを用いた通常の方法で行った。

4. エスケープの作製

希釈した完全型IgG抗体とYam/77株を1:1の容量で混合し、37°Cで1時間反応させた。この中和反応液をMDCK細胞に感染させ、37°Cで72時間インキュベートした。増殖してきたウイルスを採取し、さらに抗体存在下でMDCK細胞にて数回継代し、各ワクチン株に対する反応性を中和試験で確認した。

C. 研究結果

1. Fab抗体と完全型IgG抗体のHI活性 (Table 1)

1977-1993年までの様々な年代のワクチン株に対して広域にHI活性は示さずに中和活性を示したクローンのうち15クローンのFab抗体と完全型IgG抗体のYam/77株に対するHI活性をまとめて示した。

ほとんどのクローンで完全型IgG抗体に変換してもHI活性は認められなかったものの2クローンについて完全型IgG抗体に変換するとHI活性が検出された。また、Fab抗体では弱いHI活性を示したが、完全型IgG抗体に変換するとHI活性が検出されなかったクローンも存在した。

2. 完全型IgG抗体の中和カイネティクス (Fig.1)

完全型IgG抗体に変換したクローンのYam/77株に対する中和活性スペクトルをまとめて示した。

15クローンのうち少なくともF008-057、F037-115およびF008-039の3クローンは、完全型IgG抗体に変換すると中和活性の増強が認められた。Fab抗体ではHI活性も中和活性も示さなかったF008-057は、完全型IgG抗体に変換するとHI活性、中和活性を示すようになった。また、F032-093、F038-353およびF041-351、F041-360の4クローンでは、完全型IgG抗体に変換すると中和活性が低下あるいは、消失していた。このことから、抗体分子の大きさが中和活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

3. エスケープミュータントの作製試み

Yam/77株を親株として完全型IgG抗体15クローンに対するエスケープミュータントの作製を試みた。

完全型IgG抗体存在下でYam/77株をMDCK細胞で数回継代し、これらの抗体に中和されないウイルスの出現を確認したが、これらの抗体に対するエスケープミュータントは、現在のところ得られていない。

以上のことから、ヒト体内に存在する1977-1993年までのウイルス株に対して広域に反応性を示す中和抗体のエスケープミュータントは、Yam/77株からは出現し難いことが示唆された。

Table 1. 各クローンのFab型抗体とIgG型抗体のYA/77株に対する反応性の比較

| クローン | Fab型抗体 | | IgG型抗体 |
|-------------|----------------------|------|--------|
| | 中和活性 % inhibition | HI活性 | HI活性 |
| F008-057IgG | 0 | <2 | 128 |
| F008-039IgG | 51.4 | <2 | <4 |
| F019-102IgG | 93.5 | 16 | 16 |
| F020-121IgG | 70.2 | <4 | <4 |
| F020-334IgG | 91.8 | <4 | <4 |
| F032-072IgG | 78.9 | <4 | <4 |
| F032-093IgG | 89.7 | <2 | <4 |
| F037-115IgG | 55.4 | <4 | <128 |
| F038-006IgG | 56.6 | <2 | <4 |
| F038-172IgG | 100 | 4 | <4 |
| F038-270IgG | 69.6 | <2 | <4 |
| F038-353IgG | 81.0 | <2 | <4 |
| F041-342IgG | 93.5 | <2 | <4 |
| F041-351IgG | 93.5 | <2 | <4 |
| F041-360IgG | 91.3 | <2 | <4 |

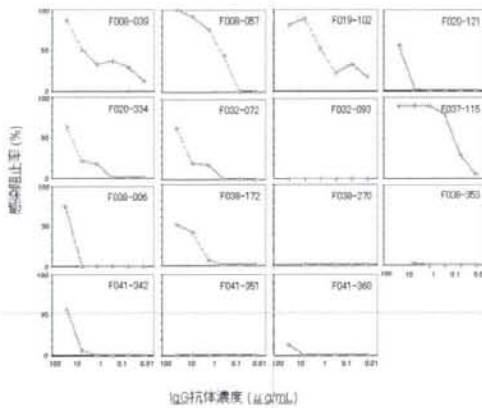


Fig.1 完全IgG型抗体のYA/77株に対する中和活性

D. 考察

成分採血で得られたリンパ球を材料に、ファージディスプレイ法を用いて得られた多数のAH3ワクチン株に対するヒトFab抗体のうち、1977～1993年までの様々な年代のワクチン株に対してHI活性はほとんど示さずに中和活性を示した15クローンについてFab抗体と完全型IgG抗体の1977年の株に対するHI活性と中和活性の詳細な解析を行った。

Fab抗体を完全型IgG抗体に変換してHI活性および中和活性の変化をみると、その活性の変化は4種類に分かれた。Fab抗体からIgG抗体に変換しても同程度の活性をしめしたものの、Fab抗体ではHI活性陰性で中和活性は中程度陽性であったが、IgG抗体に変換するとHI活性は陰性のままで中和活性が増強したもの、また、Fab抗体ではHI活性は陰性で中和活性は陽性であったが、IgG抗体に変換すると中和活性も陰性に変化したもの、あるいはFab抗体では、HI活性も中和活性も示さなかったが、IgGに変換するとHI活性および中和活性ともに増強したものの4種類である。Fab抗体をIgG抗体に変換して認められた活性の変化は、抗体のHA結合部位や中和活性の作用機序にも依存するが、抗原結合部位の1価から2価への増加と抗体分子の大きさによるものと推察される。

また、これらの中和抗体に対してYam/77株を親株にしてエスケープミュータントの作製を試みたが、抗体存在下で数代継代してもエスケープミュータントが出現しなかった。昨年19年度の報告で、1993年～2003年までの様々な年代のワクチン株に対してHI活性陽性で中和活性を示したクローンについてエスケープミュータントを作製したが、HI活性を示す抗体は、HA分子上の頭部に存在するレセプター結合部位周辺の高頻度に変異が生じる部位近傍を認識していたため容易にエスケープするウイルスが得られたと考えられる。また、抗体が中和活性を示した一番最近のAWyoming/3/03株を親株としことが、エスケープミュータント作製を容易にしていた可能性も考えられる。今回のHI活性陰性の中和抗体は、おそらくHA分子の頭部ではなく、比較的変異の生じ難い幹部あるいは頭部と幹部の中間部位に抗原決定部位が存在しているためにエスケープミュータントが出現し難いものと考えられる。また、Yam/77を親

株としたためにエスケープミュータントを作製難しくしていた可能性も考えられる。この場合、1993年の株を親株にするとエスケープミュータントが得られる可能性もあると考えられる。

E. 結論

ヒト体内に存在するインフルエンザウイルスに対する中和抗体は、抗体分子の大きさが中和活性に影響を及ぼすことが明らかになった。

また、インフルエンザワクチン株 (H3N2) に対して広域に中和活性を示すヒト抗体からエスケープする変異株は、Yam/77 株では出現し難いことが示唆された。

F. 研究発表

1. Ueda M., Yamate M., Anariwa D., Daidoji T., Okuno Y., Ikuta K. and Nakaya T., 2008. Maturation efficiency of viral glycoproteins

in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Research*.136, 91-97.

2. 奥野良信: 新型インフルエンザの脅威. *JIM (Journal of Integrated Medicine)*, 18(7): 558-560, 2008
3. 奥野良信: 新興感染症の現状と対策. *防菌防黴*, 36(7): 449-454, 2008
4. 福家 功, 奥野良信: インフルエンザワクチン. *からだの科学*, 259: 130-133, 2008

- #### G. 知的財産権の出願、登録状況
- なし。

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)
分担研究報告書

抗 VZV 治療用ヒト抗体の臨床試験

分担研究者 白木 公康 富山大学 医学薬学研究部 (医学) ウイルス学
協力研究者 赤堀 泰 藤田保健衛生大学総合医科学研究所
協力研究者 鈴木 和宏 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨

今回、これまでに取得された水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に対する中和活性を有するヒト型抗体の性状について、その水痘ウイルスに対する特殊な効果を見出したので、その効果について解析した。水痘ウイルス糖タンパク gH は、ウイルス感染価の中和の標的であり、そのモノクローナル抗体はウイルス感染性を中和する。さらにこの抗体は、感染細胞が広がるのを阻止する活性がある。そこで、ウイルス感染後、この抗体の存在下では、ウイルス感染の広がりを認めないだけでないが、細胞内には感染性を有するウイルスが存在する。この感染細胞の感染性ウイルスは時間とともに感染性を消失していく。そして、3~4 週間すると感染性ウイルスは全く検出されなくなるが、ウイルスゲノムは検出できるという潜伏感染に近い状況が誘導されることが明らかになった。このように、この抗体を治療に使用した場合には感染が広がらず、感染を終息できることが示された。

研究目的

水痘は非常に伝染力が強く、未感染母体から新生児への感染、また免疫不全者にとっての感染は重篤となることが知られている。さらに、骨髄・臓器移植時や化学療法治療時の VZV 感染重篤化はリスクファクターの 1 つである。新生児水痘は死亡率が約 30%とされ、ハイリスク患者への感染予防及び軽症化のために、米国では帯状疱疹回復期血清由来の VZIG が使用されてきたが近年製造中止となり、現在では治験薬とし

て VariZIG が用いられているがこれも血清由来である。このように、高力価免疫グロブリンの有効性が示されているがヒト血清由来である点は改善されるべきであり、わが国にはそのような貴重な血清を得るシステムはない。本事業で得られた成果である「VZV に対する中和活性を有するヒト型抗体産生システム」は VZIG を代替するのに十分な活性を有している。抗ウイルス薬が一般使用されるようになった現在でも、VZV の予防治療には VZV 高力価の免疫グロブリン

ン製剤を用いることが期待されており、その応用範囲は広いと考える。

本研究の目的は単離した中和抗体について製剤化する道筋をつけることである。これまでの研究で VZV に対し中和活性を有する抗体クローンを複数単離し、それらに関する IgG 抗体産生系を樹立できた。今期の研究は最も治療効果を示す抗体を選び出すとともに、疾患モデル動物に対して薬効を示すことで臨床試験開始の条件整備を行うことを目標としている。

上記の過程において、単離抗体がこれまで検討した水痘に対する中和能だけでなく、免疫低下時等に再発とされる帯状疱疹の発症予防にも効果があるか、*in vitro* におけるモデル実験「抗体による感染終息と潜伏感染系のモデル実験」を行ったので報告する。

B. 研究方法

本研究は白木グループが VZV 中和抗体の活性検討および動物試験等を担当し、ヒト抗体への変換と発現一調製を黒澤グループが担当するという分担で実施された。

これまでの研究において取得された VZV 中和抗体 6 クローン (クローン No. :10, 24, 36, 60, 94, 431) は *in vitro* 実験において中和活性として十分な能力を持っていること、またその内 2 クローン (24・94) は特に強い活性を有することがこれまでの検討で明らかになっている。

単離抗体がこれまで検討した水痘に対する中和能だけでなく、免疫低下時等に再発とされる帯状疱疹の発症予防にも効果があるか、*in vitro* におけるモデル実験を行ったので報告する。

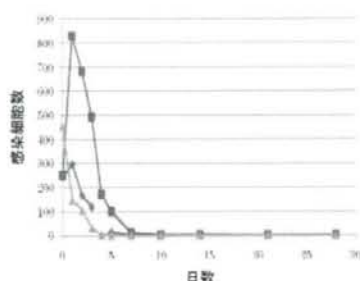
方法

最も中和活性が強い No. 94 の IgG 型を用いて、帯状疱疹の発症予防にも効果があるか新しいコンセプトの中和試験を行った。これまでの中和活性測定においては、ウイルスと抗体を共存させた後に細胞に感染させ、その抗体の中和能を測定していた。

今回、ヒト水痘ウイルスの潜伏感染系のモデル実験として VZV ウイルス感染後の細胞に中和抗体を長期間作用させ、その結果感染細胞の感染能力を低下させることができれば、中和抗体による水痘の感染拡大阻止が可能となると考えた。また、この状態は潜伏感染状態と考えられるので、VZV の再活性化抑制、すなわち「帯状疱疹の発症阻止」機構に抗体が関与していることを示す根拠が得られるものと考えている。

12 穴プレートのヒト胎児肺細胞に、VZV を感染し、通常培地で、2 時間培養後に、クローン 94 抗体 15 μ g/ml を含む培地で培養を行った。感染 2 時間、1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, 28 日後に、細胞をトリプシン処理して作成した細胞浮遊液を、6cm シャーレの細胞上に播種し抗体非存在下で 1 週間培養し、形成されたブラック数を測定した。そして、3 穴からのブラック数の平均値とした。培養 28 日後の細胞を 41 度 1 時間処理、 α -ブチレート、TPA 処理、あるいは、サイトメガロウイルス感染アデノウイルス、ライノウイルス、熱不活化水痘ウイルスを感染させ、潜伏ウイルスの再活性化を検討した。

C. 結果



図の様に、感染直後には、ブラックを形成できる状態で細胞内にとどまっていた感染性ウイルスは、急速にその感染性を喪失していった。12 穴の細胞にはウイルス特有の細胞変性を認めず感染細胞数の増加を認めないことからウイルスは、広がっていないことがわかる。このように、一度ウイルスが感染して、ウイルス増殖・ブラック形成能を有する細胞が、抗体処理 1 週間程度でその感染増殖能を失うことが明らかになった。さらに、他のウイルスなどでは、ウイルスの再活性化に効果があると報告されている種々の方法を検討した。感染 28 日後に、41°C 1 時間処理、n-ブチレート、TPA 処理、あるいは、サイトメガロウイルス感染アデノウイルス、ライノウイルス、熱不活化水痘ウイルスを感染させたが、感染性水痘ウイルスは、回収できなかった。また、抗体処理 28 日後の細胞を抗体非存在下で、2 ヶ月間培養したが、ウイルスは回収できなかった。この細胞内での水痘ウイルスの感染性喪失過程は不明であるが、ウイルスゲノムの存在は検出できた。ウイルス感染細胞が感染性を喪失したものに関して種々な方法を試みたが、容易にウイルスゲノム

の感染性を取り戻すことはできなかった。

この抗 gH 抗体による感染性の喪失は、抗 gH 抗体による水痘や帯状疱疹の予防や治療を考える際には重要な意義を持つ。すなわち、水痘や帯状疱疹に際して、感染した細胞は、この抗体によってウイルス感染にもかかわらず、ウイルスの増殖を許さず、抗体の存在下で感染性を喪失し、治癒につながることを意味する。この点では、抗ウイルス薬より強力に感染の拡大を阻止できることを意味している。

これらの結果は、中和抗体によって感染細胞の不活化が起き、その結果ヒト水痘ウイルスの潜伏感染状態が誘導されたことを示唆している。

次に、抗体処理によって感染性を喪失した細胞においてウイルスが再活性化可能かどうかについて検討を行った。まず、ウイルスチミジinkinナーゼ (TK) 遺伝子を B 型肝炎表面抗原 (HBs) 遺伝子に置き換えたウイルスを感染したのち、抗体処理でウイルスの感染性を喪失した。そこに、野生株水痘ウイルスを感染させ、その感染細胞を新たに感染した感染細胞から、cell-free ウイルスを得た。そして、シャーレに培養した HEL 細胞に感染させ、アシクロビルで非感受性の HBs 抗原を発現する組換えウイルスを回収した。TK を HBs に置き換えた virus はアシクロビル非感受性であるので回収されたウイルスには不活化細胞内に存在していたものが含まれることが示された。このことは感染性を喪失したウイルスは、野生株によって感染性を取り戻したと考えられた。したがって、この系では、感染に使用したウイルスは、感染性は喪失しているが再活性化できる状態で存在していることが

わかった。

D. 考察

VZV と同じヘルペス属の単純ヘルペスウイルス「HSV」は神経線維の中を通過して末梢へ到達するので抗体が作用できないが、帯状疱疹では、抗体がアクセスできる神経線維を介して末梢へ到達するので、感染が末梢へ到達するのを抗体が阻止できることが可能である。

正常なヒト体内中では、VZV に初感染で水痘発症した後 VZV ウイルスは体内から消失することはなく、神経節に潜伏感染する。後に様々な理由で免疫機能が低下した場合 VZV ウイルスが再活性化して神経節より末梢へ向かって増殖し、帯状疱疹が発症するとされている。細胞性免疫が低下した際、即時には帯状疱疹が発症することは少ない理由として、抗体も即時に同じように無くなるわけではないので、体内中に残存している抗体で感染拡大を阻止しているからと考えることができる。抗体の産生能低下が長期間継続されることで残存抗体が消失した結果、帯状疱疹が発症すると考えられる。開発した中和抗体の体内投与することにより、VZV 感染細胞が神経節に存在していても感染は末梢神経に広がらず、帯状疱疹を

予防できる可能性があると考えられる。

E. 結論

帯状疱疹の発症予防にも効果があるか in vitro におけるモデル実験を構築して検定した結果、臨床応用に有用であると思われる結果を得た。今後、臨床開発に向けた詳細な試験を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Y.Akahori, K.Suzuki, T.Daikoku, M.Iwai, Y.Yoshida, Y.Asano, Y.Kurosawa and K. Shiraki, Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H, *Journal of Virology* 83, 2020-2024, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)
分担研究報告書

治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究
(抗サイトメガロウイルスヒト抗体を対象として)

分担研究者 浅野 喜造 藤田保健衛生大学 医学部
研究協力者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学 医学部
太田 茜

研究要旨

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染症は、近年増加傾向にある臓器移植患者あるいは AIDS 患者において重症化し問題となる。HCMV 感染症対策としては、γグロブリン製剤による重症化予防や抗ウイルス薬による治療が行われているが、それらは副作用や感染性病原体の混入といったリスクを完全に払拭することは難しく、より安全で効果の高い新たな治療法の開発が望まれている。我々は、黒澤らが作製した、HCMV 抗体陽性健康成人の成分血由来ヒト抗体ライブラリーより、HCMV を中和するヒト抗体クローンを単離し、最終的には人工抗体による HCMV 感染症の新たな治療法の開発を目指している。

本研究では、HCMV の中和抗原のひとつ glycoprotein B(gB)に結合活性を示すヒト抗体クローンを多数単離し、そのうち少なくとも 3 種 (H05, H08, H14) の IgG 抗体は補体依存的中和活性を示した。そのうち H05 抗体は抗ウイルス薬耐性臨床分離株についても同様の中和活性を示し、感染拡大を抑制する効果も認められた。今後は、本研究で得た H05 抗体を含め、完全ヒト抗体による新たな治療法の可能性を検討していく。

A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、乳幼児期に不顕性感染し、生涯にわたって潜伏感染する。免疫機能が正常な人では、初感染や再感染時に無症状に経過するが、近年増加傾向にある移植後患者あるいは AIDS 患者等の免疫機能が低下した患者における HCMV の再活性化や再感染は、重篤な症状を引き起こす。また、近年は日本でも若年者での抗体陽性率が低下しており、妊婦の初感染に伴う先天性 CMV 感染

症のリスクも懸念されている。現在は、抗ウイルス薬であるガンシクロビル(GCV)等による治療、あるいはγグロブリン製剤による重症化の予防が行なわれている。しかしながら、抗ウイルス薬には骨髄抑制や腎毒性といった副作用があることに加え、耐性株の出現も多数報告されている。一方、γグロブリン製剤は血液製剤であり、未知の病原体混入のリスクは完全に払拭できない。このような状況から、HCMV 感染症の新たな治療薬が強く望まれている。本事業で

は、HCMV 感染症の予防あるいは治療薬となりうる人工のヒトモノクローナル抗体の製剤化を目指している。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。前年度までに、HCMV の中和抗原の一つ glycoprotein B(gB)の組換えタンパク(以下、gB654)、および HCMV ウイルス粒子それぞれ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、前期までに作製した完全ヒト抗体 (IgG₁ 型抗体) を用いて、今期はそれらの中和能を検討した。

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、抗体分子の変部位を構成する遺伝子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、7 クローン(H02, H03, H04, H05, H08, H09, H14)の IgG₁ 型抗体を作製した。本抗体は、各クローンの 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。また、臨床分離株への応答性を検討するため、91S, 93R 株(Harada ら *Arch. Virol.* 142 p215: 1997)を用いた。中和のコントロールとして、γグロブリン製剤のうち Venilon((株)化血研, 25mg/ml)を使用した。

C. 研究結果

1) 抗 HCMV 抗体クローンの結合力とエピトープ

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。

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 1)。

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。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 (I):H05,