

3. Mutations in HTLV-1 LTR generated by ZFN in an ATL cell line S1T

ZFN1/2

	501 (D13784 numbering)		Modifications
HTLV-1 LTR WT	cgtcccttggagcctacctaagactcagccggcctccacggcttgacctgaccctgcttget		
ZFN1+2 clone f-1	cgtcccttggagcctacctaagactcagccggc-----acggcttgacctgaccctgcttget		5 bp deletion
ZFN1+2 clone a-1	cgtcccttggagcctacctaagactcagcc-----acggcttgacctgaccctgcttget		8 bp deletion + 1 mutation
ZFN1+2 clone b-3	cgtcccttggagcctacctaagactcagccggcctc-----tgacctgaccctgcttget		9 bp deletion
ZFN2+1 clone b-2	cgtcccttggagcctacctaagactcagcc-----tcctccacggcttgacctgaccctgcttget		3 bp deletion
ZFN2+1 clone b-4	cgtcccttggagcctacctaagactcagca-----gacctgaccctgcttget		18 bp deletion
ZFN2+1 clone b-1	cgtcccttggagcctacc-----acggcttgacctgaccctgcttget		19 bp deletion

ZFN3/4

	621 (D13784 numbering)		Modifications
HTLV-1 LTR WT	aaagtTCCACCCCTTCCCTT-----TCATTCACGACTGACTGCCGGCTtgcccacggccaa		
ZFN3+4 clone c-1	aaagtTCCACCCCTTCCCTTCCCTTCAATTCACGACTGACTGCCGGCTtgcccacggccaa		2 bp insertion + 1 mutation
ZFN3+4 clone b-2	aaagtTCCACCCCTTCCCTT-----TC-----CACGACTGACTGCCGGCTtgcccacggccaa		3 bp deletion
ZFN3+4 clone b-1	aaagtTCCACCC-----GACTGACTGCCGGCTtgcccacggccaa		16 bp deletion
ZFN3+4 clone a-1	aaagt-----GCGGGCTtgcccacggccaa		32 bp deletion
ZFN4+3 clone a-1	aaagtTCCACCCCTTTC-----TCATTCACGACTGACTGCCGGCTtgcccacggccaa		4 bp deletion
ZFN4+3 clone a-2	aaagtTCCACCCCTTCCCTT-----T-----ACTGCCGGCTtgcccacggccaa		12 bp deletion
ZFN4+3 clone b-1	aaagtTCCACCCCTTCCCT-----GACTGCCGGCTtgcccacggccaa		14 bp deletion
ZFN4+3 clone c-2	aaagtTCCACCCCTTCCCTT-----T-----TGGGCTtgcccacggccaa		16 bp deletion + 1 mutation
ZFN4+3 clone c-1	aaagtTCCACCCCTTTC-----aa		38 bp deletion

分担研究課題：治療分子による抗 ATL 効果の *in vivo* における評価

研究分担者 岡田 誠治 熊本大学・エイズ学研究センター 教授

研究要旨 成人T細胞性白血病(ATL)は、腫瘍ウイルスである HTLV-1 感染を原因とする極めて予後不良の悪性腫瘍である。現時点では根本的治療法がないため、新たな治療法の開発が望まれている。本研究では、高度免疫不全マウスに ATL 細胞株を移植することで ATL マウスモデルを作成し、新規治療分子として期待される LTR 認識 ZFN について ATL 細胞 ED の腫瘍形成に対する治療効果を *in vivo* で評価した。レトロウイルスベクターで ZFN1+2 を導入した ED 細胞は対照となる ZFN2+2 細胞と比較して有意に腫瘍形成が抑制された。これは ZFN が ATL の治療分子として有用である事を示唆している。また、本実験系は ATL の抗腫瘍作用を評価する実験系としての有用性が期待される。

A. 研究目的

成人 T 細胞性白血病 (Adult T cell leukemia/lymphoma: ATL)は、腫瘍ウイルスである Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1)感染を原因とする極めて予後不良の悪性腫瘍である。現時点では根本的治療法がないため、感染予防・発症予防と新たな治療法の開発が望まれている。

本研究の目的は、成人T細胞性白血病(Adult T cell leukemia: ATL)のマウスモデルを作成し、治療分子の治療効果を経時的・定量的に解析する系を樹立し、ATL の病態解析と新規治療法の開発に供することである。

B. 研究方法

治療効果の *in vivo* 解析に適した様々な高度免疫不全マウスを樹立した。これらのマウスに蛍光色素等を遺伝子導入したATL細胞株を移植して、ATLモデルマウスを作成し、ATLの病態

解析及び治療薬の経時的・定量的な評価系を樹立した。本系を用いて、新規治療分子として期待されるLTR認識ZFN、及び様々な治療薬候補の *in vivo* における有効性の検証を行った。

(倫理面への配慮)

免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行っている。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリーB（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。

C. 研究結果

1) mCherry 発現 ATL 細胞株の樹立

ATL 細胞株 MT-2, MT4 に mCherry 発現ベクターを遺伝子導入し、更に赤色の強い細胞をフローサイトメトリーを用いて分取し、mCherry を強く発現する MT-2, MT4 細胞株を樹立した。

2) 高度免疫不全マウスへの ATL 細胞株移植系の樹立

MT-2 mCherry を高度免疫不全マウスである NOD/Scid/Jak3 欠損マウス (NOJ マウス) 腹腔内に移植したところ、マウス腹腔内での生着が認められた。蛍光イメージングを用いることで腹腔内の腫瘍量を定量的に解析することが可能であった本マウスに NF-kappaB 阻害薬である cepharanthine (CEP)を投与したところ腫瘍量の減少が認められた。本マウスは ATL に対する新規治療薬候補の有効性と副作用を評価するのに有用な系であると考えられる(投稿準備中)。

MT-4 細胞を Balb/c Rag-2Jak3 二重欠損(Balb/c RJ)マウス脾臓に移植したところ脾臓と肝臓への MT-4 細胞の生着が認められた。本マウスに Hybrid liposomes (HLs)を投与する事で、MT-4 腫瘍量の減少が確認された(Nano Bulletin,2012)。

Nude R/J マウス皮下にレトロウイルスベクターで ZFN1+2 を導入した ED^{ZFN2/ZFN1} 細胞と対照となる ZFN2+2 を導入した ED^{ZFN2/ZFN2} 細胞を 2×10^5 個移植した。6 週間後の腫瘍の大きさと重さを計測したところ ED^{ZFN2/ZFN1} 細胞移植群において有意に腫瘍形成が抑制された。これは、ZFN が ATL の治療分子として有用である事を示唆している (図 1 参照)。

D. 考察

赤色蛍光を遺伝子導入した ATL 細胞株(MT-2, MT-4)を高度免疫不全マウスに移植し、蛍光イメージング装置により腫瘍量を定量的に解析

する事に成功した。また、新たに開発した無毛高度免疫不全マウス(Nude RJ)マウス皮下に遺伝子導入した ATL 細胞を移植することで、ATL に対する遺伝子治療のマウスモデルを樹立した。

ヒトの様々な疾患の解析には、マウス等の小動物を使ったモデルが有用である。そのため、様々な免疫不全マウスにヒトの正常細胞や腫瘍細胞を移植する試みがなされてきた。近年、遺伝子改変マウスを用いることで高度免疫不全マウスの樹立が可能となり、ヒト細胞が生着可能なマウスが樹立されている。今回、私達が樹立した高度免疫不全マウス (NOJ マウス・Balb/c RJ マウス・Nude RJ マウス) に ATL 細胞株が生着可能であることが示された。今後、新鮮 ATL 細胞が生着可能かどうかを検証し、患者さん毎のいわゆるオーダーメイド医療に応用可能かどうかを確認したい。

本年度の研究で、ATL マウスモデルを用いた治療薬の評価系が樹立され、本系を用いて新規治療分子として期待される LTR 認識 ZFN の in vivo における評価を行った。ATL マウスモデルは、研究班の目指す HTLV-1 プロウイルスゲノム特異的 DNA 破壊酵素を潜伏感染細胞に送達してウイルスを不可逆的に不活化することによる ATL 治療の検証に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

高度免疫不全マウスに ATL 細胞株を移植することで ATL のマウスモデルを樹立した。本マウスモデルは、ATL に対する新規治療薬候補の有効性と副作用を評価するのに有用な系であると考えられる。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, Komano J*. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. **Leukemia**. In press.
2. Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, and *Okada S. Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced Vgamma9Vdelta2 T cells against primary effusion lymphoma. **Cancer Lett** in press
3. Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, Hattori S, Kimura S, and *Okada S. Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells. **Bioorg Med Chem Lett** 23(1):606-609, 2013
4. Uthaisar K, Sebwai W, Srikoon P, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, *Okada S, and *Wongkham S. Cepharanthine suppresses metastatic potential of human cholangiocarcinoma cell lines. **Asian Pac J Cancer Prev** 13 (KKSuppl) :149-154, 2012
5. Tsuruoka N, Arima M, Okada S, Sakamoto A, Hatano M, Arguni E, O-Wang J, Jing-Hua Y, Sekiya S, Shozu M, and Tokuhisa T. ADAR1 induces adenosine -targeted DNA mutations in senescent Bcl6-deficient cells. **J Bio Chem** 288(2): 826-836, 2013
6. Terahara K, Ishige M, Ikeno S, Mitsuki Y, Okada S, Kobayashi K, and Tsunetsugu -Yokota, Y. Evaluation of a Humanized NOD/SCID/JAK3^{null} Mouse Model: Expansion of CD4⁺ T cells with an Activated Memory Phenotype Affects Infectivity of CCR5-Tropic HIV-1 *in vivo*. **ProS ONE** 8(1):e53495, 2013
7. Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Kawano Y, Niiro H, Iino T, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, and Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. **Blood** in press
8. Komizu Y, Yukihara M, Ichihara H, Matsumoto Y, Okada S, and Ueoka R. Therapeutic effects of hybrid liposomes for mouse model of adult T-cell leukemia/ lymphoma *in vivo*. **Nano Bulletin** 1(1): 120105, 2012
9. *Hagiwara S, Yotsumoto M, Odawara T, Ajisawa A, Uehira T, Nagai H, Tanuma J, and Okada S. Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV -infected patients: an epidemiological study in Japan. **AIDS** 27(2):279-283, 2013
10. Michai M, Goto H, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, Wongkham S, and *Okada S. Soluble CD30: a possible serum tumor marker for primary effusion lymphoma. **Asian Pac J Cancer Prev** 13(10):4939-4941, 2012
11. Khaenam P, Niibori A, Okada S, Jearanaikoon P, Araki N, and *Limpaiboon T. Contribution of RIZ1 in proliferation and migration of liver fluke-related cholangiocarcinoma cell line. **Asian Pac J Cancer Prev** 13(8):4007-4011, 2012
12. *Yotsumoto M, Hagiwara S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Nagai H, Fujikawa Y, Maeda S, Kitano K, Arima N, Uno K, Iwai T, Hongo I, Ota Y, Fukutake K, Okada S. Clinical

- characteristics of human immunodeficiency virus-associated Hodgkin lymphoma patients in Japan. *Int J Hematol* 96(2):247-253, 2012
13. Mitsuki Y, Terahara K, Shibusawa K, Yamamoto T, Tsuchiya T, Mizukoshi F, Ishige M, Okada S, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, and *Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. *J Virol* 86(13):7227-7234, 2012
 14. Taura M, Suico MA, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M, *Okada S, and *Kai H. Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 32(8):1581-1590, 2012
 15. Chihara T, Hashimoto M, Osman A, Hiyoshi-Yoshidomi Y, Suzu I, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Okada S, *Suzu S. HIV-1 Proteins Preferentially Activate Anti-Inflammatory M2-Type Macrophages. *J Immunol* 188(8):3620-3627, 2012
 16. Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Matsuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, and *Oike Y. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res* 72(7):1784-1794, 2012
 17. Tanimoto S, Sakai S, Kudo E, Okada S, Matsunuma S, Takahashi D, and *Toshima K. Target-selective photo-degradation of HIV-1 protease and inhibition of HIV-1 replication in living cells by designed fullerene-sugar hybrids. *Chemistry- An Asian Journal* 7(5):911-914, 2012
 18. Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, and *Okada S. The antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kB pathway. *Cancer Sci* 103(4):775-781, 2012
 19. Phimsen S, Kuwahara K, Nakaya T, Ohta K, Suda T, Rezano A, Kitabatake M, Vaeteewoottacharn K, Okada S, Tone S, and *Sakaguchi N. Selective cell death of p53-insufficient cancer cells is induced by knockdown of the mRNA export molecule GANP. *Apoptosis* 17(7):679-690, 2012
 20. Xi Y, Watanabe S, Hino Y, Sakamoto C, Nakatsu Y, Okada S, and *Nakao M. Hmgal is differentially expressed and mediates transcriptional silencing of the *Cd4/Cd8* loci in T cell lineages and leukemic cells. *Cancer Sci* 103(3):439-447, 2012
 21. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M and *Saya H. Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 31(23): 2849-2861, 2012
 22. Matsuno T, Kariya R, Yano S, Morino-Koga S, Taura M, Suico MA, Shimauchi Y, Matsuyama S, Okamoto Y, Shuto T, *Kai H, and *Okada S.

Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- κ B pathway. *Int J Oncol* 40(4):1071-1078, 2012

23. Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Y. Yoshidomi Y, Chutiwitoonchai N, Chihara T, Okada M, Nakamura N, Okada S, and *Suzu S. HIV-1 Nef Perturbs the Function, Structure, and Signaling of the Golgi through the Src Kinase Hck. *J Cell Physiol* 227(3):1090-1097, 2012

2. 学会発表
(国際学会)

1. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Shinichiro Hattori, Masako Shimamoto, Hiroki Goto, Manabu Taura, Takashi Nakamura, Kunihiro Kuwajima, and Seiji Okada. HAMLET and BAMLET induces cell death of primary effusion lymphoma. 41st Annual Scientific Meeting of the Society for Hematology and Stem Cells. 23-26 Aug. 2012. Hotel Okura, Amsterdam.
2. Kouki Matsuda, Shinichiro Hattori, Ryusho Kariya, Hiroki Goto, Pattaravadee Srikoon, and Seiji Okada. The anti-HIV-1 infection effects of the biscochlorine alkaloid cepharanthine. 13th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Bangkok, 25-29 Nov. 2012 (2012 JBS YSP-Travel Fellowship)
3. Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Chaisiri Wongkham, Sopot Wongkham and Seiji Okada. Bortezomib, a proteasome inhibitor, induces apoptotic and

autophagic cell deaths of cholangiocarcinoma. Molecular Medicine Conference 2012, Bangkok, Thailand, 19-22 Dec. 2012

4. Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Shinichiro Hattori, Masako Shimamoto, Takashi Murakami, Kunihiro Kuwajima, and Seiji Okada. HAMLET and BAMLET Induces Cell Death of Primary Effusion Lymphoma. Molecular Medicine Conference 2012. Alternative strategies against cancer and inflammation. Bangkok, Thailand, 19-22 Dec. 2012 (Oral Presentation Award).

(国内学会)

1. 松田幸樹、刈谷龍升、服部真一郎、古水雄志、上岡龍一、岡田誠治. 膜流動性変化が及ぼす HIV-1 感染への影響. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター、大阪、2012 年 6 月 29 日〜30 日
2. Daisuke Nakamura, Makoto Yoshimitsu, Junko Niimoto, Ayako Kuroki, Yohann White, Kimiharu Uozumi, Seiji Okada, Naomichi Arima. Establishment of an ATLL xenotransplant mouse model using the NOD/SCID/Jak3 null (NOJ) mouse. 第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館、京都、2012 年 10 月 19-21 日、
3. Hiroki Goto, Takumi Yajima, Kouki Matsuda, Eriko Kudo, Masako Shimamoto, Ryusho Kariya, Shinichiro Hattori, Manabu Taura, Harutaka Katano, and Seiji Okada. A potential role of VEGF for the fluid retention in primary effusion lymphoma. 第 74 回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館、京都、2012 年

10月19-21日

4. Makoto Yamagishi, Harutaka Katano, Kazumi Nakano, Yasunori Ohta, Tsunekazu Hishima, Seiji Okada, and Toshiki Watanabe. miRNA signature and its functional involvement in aggressiveness of diffuse large B cell lymphoma. 第74回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館、京都、2012年10月19-21日
5. Yuki Hiromichi, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Hiroaki Niuro, Hiroyuki Hata, Seiji Okada, Toshiki Watanabe, Koichi Akashi, Hiroaki Mitsuya, and Yutaka Okuno. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. 第74回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館、京都、2012年10月19-21日
6. 矢島 琢己、後藤 裕樹、岡田 誠治. 原発性滲出液リンパ腫に対するエピガロカテキンガレートによる抗腫瘍効果の検討. 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪国際会議場 大阪 2012年11月13-15日
7. 大杉 剛生、石田 尚臣、島崎 達也、岡田 誠治、梅澤 一夫. HTLV-1 Tax-Tg マウスにおける p53 および NF- κ B の動態. 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪国際会議場 大阪 2012年11月13-15日
8. 田浦学、刈谷龍昇、工藤恵理子、後藤裕樹、岡田誠治. 副作用誘導因子である小胞体ストレスに着目した HIV protease inhibitor の評価. 第26回日本エイズ学会、横浜 2012年11月24-26日
9. 歙田伸好、青木宏美、服部真一郎、林宏典、Amber Moore、青木学、岡田誠治、満屋裕明. 抗 HIV 剤 raltegravir による HIV 体内播種早期ダイナミクスの変容. 第26回日本エ

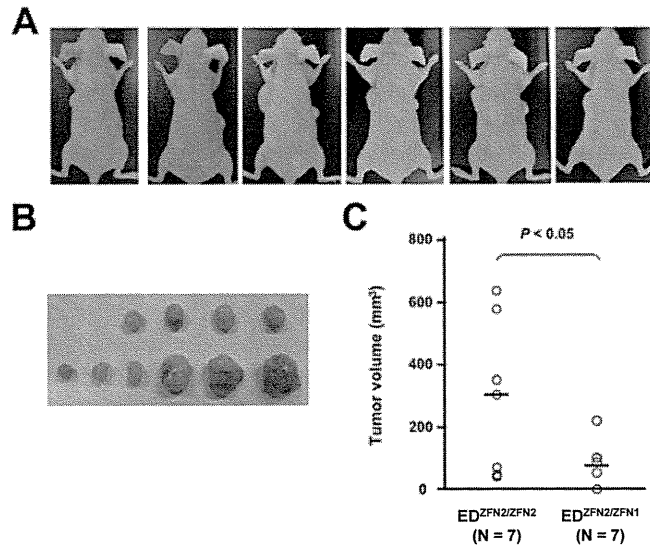
イズ学会、横浜 2012年11月24-26日

10. 鈴木一雄、服部真一郎、前田洋助、石田尚巨、David Cooper、岡田誠治、Anthony Kelleher. プロモーター領域を標的とした siRNA は HIV-1 の増殖抑制を誘導する (in-vivo の実験系による評価). 第26回日本エイズ学会、横浜 2012年11月24-26日

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録
特記すべきことなし
3. その他
特記すべきことなし

☒ 1. Inhibition of tumorigenesis by an ATL cell line ED in a mouse model



分担研究課題：In silico maturation 法に基づく scFv の改良

研究分担者 星野 忠次 千葉大学・大学院薬学研究院 准教授

研究要旨 HTLV-1 潜伏感染細胞に、ウイルスゲノム機能不全を誘導する特異的酵素を送り込むことが、HTLV-1 関連疾患発症遅延法の概念である。この技術では、抗体により細胞種指向性を向上させた偽レンチウイルスにより、標的細胞へのタンパク質送達を実現する。CD4 陽性 T 細胞は、HTLV-1 の主な感染標的である。本研究では CD4 の D1 ドメインを目標抗原とし、これに特異的に結合する H0538-213 抗体を利用する。本分担研究では、送達技術の要となる CD4 特異的 H0538-213 抗体に関して、抗原認識能の向上を目的に、コンピューター内で抗体を成熟させる計算を行った。これは H0538-213 抗体の相補性決定領域 (CDR) にアミノ酸改変を導入して、抗原と抗体との結合親和性の向上を図るものである。抗体成熟計算の結果、親和性向上が期待されるアミノ酸の変異候補を幾つか得た。抗体成熟計算から得られた結果を確認するために、アミノ酸変異を導入した H0538-213 抗体と CD4D1 ドメインの結合定数を実験により測定する必要がある。この目的で、CD4D1 ドメインならびに H0538-213 抗体の一本鎖 Fv 領域 (scFv) の発現精製を進めた。

A. 研究目的

本研究班では、HTLV-1 陽性未発症者における HTLV-1 関連疾患の発症遅延を目的に、新規治療技術の開発を進めている。具体的には、① HTLV-1 LTR を破壊してプロウイルスゲノム機能不全を誘導する特異的酵素を、②細胞種指向性を向上させた新規タンパク質送達技術またはレンチウイルスベクターにて潜伏感染細胞に送達し、ウイルス遺伝子発現を不可逆的に阻止することを開発目標としている。①の治療分子には HTLV-1 LTR を特異的に結合して損傷させる遺伝的改変型亜鉛フィンガータンパク質と二本鎖 DNA を分断する酵素の融合タンパク質 (ZFN) が用いられる。②の治療酵素分子の送

達には、レンチウイルスベクターによるタンパク質直接導入系 (LENA) を応用する。この技術は、研究代表者の駒野によって開発されたものである。以上により、潜伏感染するプロウイルスゲノムを物理的に傷害して病原性を欠落させることが可能なため、有効な HTLV-1 感染症技術の一つになると期待できる。

②の治療酵素分子送達では、HTLV-1 の主な感染標的である CD4 陽性 T 細胞を目印として治療分子送達を行う。酵素分子送達における細胞腫選択性を高めるために、scFv 化膜アンカー型抗 CD4 抗体によるベクター被覆を計画している。CD4 を認識する抗体 H0538-213 は、研究分担者の竹腰 (東海大学) によって見出されたもので

ある。本分担研究では、細胞選択性を向上させるために、抗 CD4 抗体の CD4 認識能を高める抗体の改変を進めている。抗 CD4 抗体から一本鎖 Fv を作出し、これを分子送達の鍵となる機能部品として利用する。CD4 認識能を向上させるために、分子計算に基づいて CDR のアミノ酸の一部を改変する。さらに改変の有効性を実証するための、生化学実験を進める。本研究で開発される分子送達技術は、HTLV-1 感染症治療以外にも応用可能な基盤医療技術になると期待される。

B. 研究方法

B-1 抗体成熟計算

抗体 H0538-213 は、CD4 を認識標的とするが、H0538-213 抗体と CD4 との結合構造の X 線結晶構造解析は進んでおらず、具体的に CD4 のどの部分が認識部位かは明確ではない。但し、CD4 の部分ペプチドと H0538-213 抗体との反応性に関する実験から、CD4D1 の 81-92 残基目からなる 12 アミノ酸残基ペプチドが、H0538-213 抗体の反応部位であることが判っている。そこで、CD4 に関する X 線結晶構造 (PDB#2B4C) を参照して、抗原側の標的部位を推定する。

抗体 H0538-213 も CDR 部位の詳しい構造は不明である。抗体 H0538-213 は、CDR の H3 配列に特徴がある。PDB にはヒトの Fab 構造が、凡そ 600 件ほど登録されている。この 600 件の構造データの CDR 配列を検索して、X 線結晶構造 (PDB#3EYF) が最も抗体 H0538-213 に近いと判断した。そこでこの 3EYF 結晶構造を雛形にして抗体の計算構造を構築する。

抗原 CD4D1 と抗体 H0538-213 の結合構造を予測するために、タンパク質ドッキングプログラムの一つの ZDOCK を用いた。但し、ZDOCK では可能性のある構造が多数出力されるため、詳細に

構造を検討して適切と考えられる結合構造の候補を 10 個程度までに絞る。これらに対して、分子動力学計算 (AMBER11 ソフトウェア) を実行して、安定な結合構造を算出する。この分子動力学計算は、抗原と抗体の複合体の周りに溶媒水を発生して実行する。

選定された抗原-抗体の複合体構造候補に対し、抗体の成熟を計算機上で自動的に行う *in silico maturation* プログラムを実行する。本プログラムでは、特定の抗原構造に対して、抗体分子の相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸が変化することで、抗体はより高い結合親和性で抗原を認識できる。抗体の成熟を実現するために、出発となる試行抗体に対し計算機上でアミノ酸変異を導入し、アミノ酸変異を導入した抗体と標的抗原との結合親和性を評価して、より親和性が向上した場合に、アミノ酸変異を導入した抗体を次のステップの試行抗体に採用する。このステップを繰り返していくことで、抗体の成熟を仮想的に実現する。

本ソフトウェアは、導入するアミノ酸変異のパターンを何種類も用意して、同時に並行して計算し、最も良いものを選択できるようにしてある。この際に大型計算機センターで使用されるような、演算性能の高い高速演算システムでソフトウェアが実行できるように、並列計算のためのプログラミングが成されている。

B-2 結合親和性確認実験

計算による抗体成熟アミノ酸改変の有効性を実験により実証するために、抗原 CD4D1 ならびに抗体 H0538-213 の発現精製を行う。両者のサンプルを用いて、等温滴定量熱計 (ITC) により抗原-抗体結合に与る熱量を測定することで、エネルギー的に親和性を確認する。

抗原CD4D1は、塩基配列をpET50(b) (Novagen) に導入し、大腸菌Rosettaで発現させた。大腸菌培養中にOD値が0.6になったときに、0.4mM IPTGを投入して、発現を誘導する。IPTG投入後、30°Cで一晩培養する。培養液から大腸菌を遠心にてペレットダウンし、これを再懸濁の後に、超音波破砕機で菌膜を破砕する。溶出した細胞液を遠心機に掛けた後に、上精よりNiカラムにてNus-tag融合CD4D1を得る。HRV3C酵素にて、Nus-tag融合部分を切断する。切断されたNus-tag部位は、Ni-NTAで取り除き、Ni-NTAから素通り画分として得られた溶液を、ゲルろ過カラムに掛けて、精製されたCD4D1を得る。

抗体 H0538-213 は、発現配列を pET21(b) (Novagen) に導入し、大腸菌Origami Bで発現させた。培養大腸菌液がOD値0.5になったときに、0.1mM IPTGを投入して、発現を誘導する。IPTG投入後、26°Cで40時間程、培養する。培養液から大腸菌を遠心にてペレットダウンし、これを再懸濁の後に、フレンチプレスで菌膜を破砕する。溶出した細胞液を遠心機に掛けた後に、上精よりNiカラムにてHis-tag融合scFvを得る。イオン交換カラムに掛けて、精製されたscFvを得る。

精製した抗原CD4D1と精製した抗体scFvを、それぞれ10mMの濃度にして、セル側に抗体scFvを、シリンジ側に抗原CD4D1を入れて、ITCにより、結合により生じる熱量を測定する。セルの温度は30°Cに設定する。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

C-1 抗体成熟計算

抗原 CD4D1 の構造については、PDB に登録さ

れた X 線結晶構造 (2B4C) を参照して作成した。抗原 CD4D1 は、主に β シート構造から形成されている。81-92 残基目のアミノ酸ペプチド部位は、ターン構造を取り、溶媒中に露出している部分であることが判る (図 1)。従って、この部位が抗体 H0538-213 の認識部位である可能性が極めて高い。

抗体 H0538-213 の scFv 構造は、PDB に登録された X 線結晶構造 (3EYF) を参照して作成した。但し、3EYF は抗体のみを結晶化して得た構造であるために、抗原が結合している場合には、CDR の構造が大きく変化する可能性がある。3EYF 結晶構造では、明らかに CDR の 6 つの β ターン部位が狭くなっており、抗原の結合する空間がない。そこで計算機上で CDR の β ターンに仮想的な力を引加して CDR が開いた構造を作成した (図 2)。

ドッキングシミュレーションプログラム (ZDOCK) で得られた構造を基に、12 個の結合構造に対して、構造のエネルギー極小化計算を行った。この中から最も適当と思われる 2 組の結合構造を選び出し、10 nsec の分子動力学計算を実施した (図 3)。結合構造から判断して、最終的に一つの構造に絞りこみ、アミノ酸残基の変異や挿入あるいは削除を自動的に行う抗体成熟化プログラムを実行した。絞り込まれた構造では、CD4D1 の 85 番目の Glu および 90 番目の Lys が、CDR 側に向いており、それぞれの負の電荷ならびに正の電荷部位が、抗体側の荷電アミノ酸と相互作用するような構造をとっている。

抗体成熟化計算では、100 回の繰り返し計算を行った。計算の進行に伴い、抗体と抗原の間の相互作用エネルギーが低下した (図 4)。最初の 17 サイクルまでは、エネルギーの急激な

低下が見られたが、この後に 50 サイクルまではエネルギー低下は穏やかに進んだ。55 サイクル以降は、エネルギーの低下が見られなかった。計算中における CDR のアミノ酸配列について、37 サイクル目と 56 サイクル目の配列を取り、これを初期 H0538-213 の配列と比較した(図 4)。変異の導入において、アミノ酸変異の選択には、プログラム中では一部で乱数を使用している。従って、計算は試行により必ずしも同一の答えを与えるとは限らない。そこで同様の計算を初期構造を使って、再度、抗体成熟化プログラムにより 100 回の繰り返し計算を行った(図 5)。

2 回の試行計算を比較して、有望なアミノ酸変異を推測した(図 6)。アミノ酸変異の大きな特徴として、CDR の L3 で、2 番目の Gln が Tyr などの芳香環を持つ残基に変化すると有利なことが判る。CDR の H2 では、1, 2 番目に無極性の芳香環の存在が有利である。また H2 領域の中心には水素結合を形成できるアミノ酸の挿入が有望である。CDR の H3 では、2 番目の負荷電アミノ酸残基が正のアミノ酸残基に、8 番目の Cys が他の大きなアミノ酸残基に変化すると有利であることが推測される。

B-2 結合親和性確認実験

モデル抗体である HyHel-10 の scFv とその抗原である Lysozyme を用いた実験では、精度の高い ITC 測定実験が実行でき(図 7)、抗体分子の発現と熱量測定のと同時に準備が整った。

抗原 CD4D1 は、大腸菌で十分な量の発現量があった。また精製も問題がなく、純度の高い状態で目的分子が得られている。ELISA 試験で、確かに抗体 H0538-213 の Fab に反応することが研究分担者の竹腰により確認された。一方で、抗体 H0538-213 の scFv は、可溶性画分への発

現量が不十分で、ITC を用いた熱量測定の実施までには到っていない。

D. 考察

抗体 H0538-213 は、CDR の H3 配列に大きな特徴がある。H3 では比較的長い 17 アミノ酸残基の配列を持ち、Cys も含んでいる。PDB に登録されているヒトの Fab では、この抗体 H0538-213 に類似した配列を持つものは少なく、構造情報があまり無い。特に H3 ループが長いために、抗原の結合していない状態での X 線結晶解析構造(PDB#3EYF)では、ループ部分が捻れている。ところが、抗原と結合した際には、このループ部分の捻れがそのままである保証はない。そこで計算では、H3 ループが捻れた構造と捻れが解けて、ループが長く伸びている構造の 2 つのパターンをモデル化した。その各々について、抗原との結合予測構造を作成して、分子動力学シミュレーションを行った。結果として、目視から、ループの捻れが解けて、ループが長く伸びている構造の方を選択して、抗体成熟化計算の出発構造とした。抗体成熟化計算では結合親和性向上の予測には、計算の初期構造が極めて重要となるが、今回の抗体 H0538-213 に関しては、類似配列を持った構造既知の抗体が少ない。このために予測構造が大きくずれている可能性もあり、これが計算精度の低下を招く原因となりかねない。仮に、抗体 H0538-213 の scFv と抗原 CD4D1 の共結晶構造が得られれば、計算精度の向上に大きくつながる。本研究では、引き続き、scFv の発現精製を進めて、初期構造ならびに予測変異の精度向上を進める。

抗体 H0538-213 の scFv は、発現量が不十分で、結合親和性確認実験が進まない要因となっている。これまで抗体の scFv を用いて、Lysozyme に対する HyHel-10 抗体や、MUC-1 に対する SM3

抗体の scFv 発現精製には成功している。HyHel-10 抗体や SM3 抗体の scFv は、コードする塩基配列を pET21(b)ベクターに組み込んで発現させた。28℃での長時間の培養により、Ni カラムでの精製が可能であった。一方で、抗体 H0538-213 の scFv は、pET21(b)ベクターにおいても、培養温度や培養に用いる大腸菌の種類を変えても、ほとんど可溶性画分からは目的の抗体分子が得られない状況にある。Nus-tag を持つ pET50(b)ベクターに組み込んで発現を行ったところ十分量の Nus-tag 融合 scFv タンパク質の発現が確認された。ところが Nus-tag 融合部位を、HRV3C 酵素で切断する段階で、ほとんど切断できないことが判明した。これは恐らく抗体 H0538-213 の scFv が、Nus-tag の一部位に強く結合し、HRV3C 酵素で切断すべきペプチド部分が隠れてしまっているためと推測できる。次に GST-tag を持つ pGEX-6p-2 ベクターに組み込んで発現を行った。発現精製の温度条件ならびに培養時間等の検討を行った結果、22℃で 48 時間培養することで、可溶性画分への発現が確認できた。今後、培養量を増やして、十分量の精製抗体タンパク質 H0538-213 の取得を進める予定である。

E. 結論

抗体 H0538-213 の scFv ならびに抗原 CD4D1 の構造を計算機上で構築し、これを用いて両者の結合構造を予測した。この予測構造を用いて、抗体成熟プログラムにより、抗体 H0538-213 の抗原認識能を向上させるためのアミノ酸変異の候補を探索した。計 2 回の抗体成熟化計算の試行を実行することで、有効と期待されるアミノ酸変異を求めることができた。次に、導入するアミノ酸変異の有効性を確認するための実験が必要である。GST-tag を付けたベクターで

は、抗体 scFv タンパクの発現が確認できた。今後、精製した抗体が十分量得られれば、抗体 H0538-213 と抗原 CD4D1 との共結晶化も可能となる。結合構造が得られれば抗体成熟予測精度の向上が見込まれる。

F. 健康危機情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

H. Yanagita, S. Fudo, E. Urano, R. Ichikawa, M. Ogata, M. Yokota, T. Murakami, H. G. Wu, J. Chiba, J. Komano, T. Hoshino :
Structural Modulation Study of Inhibitory Compounds for RNase H Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase,
Chem. Pharm. Bull. 60(6), 764-771 (2012)

H. Yanagita, N. Yamamoto, H. Fuji, X. Liu, M. Ogata, M. Yokota, H. Takaku, H. Hasegawa, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Hoshino :
Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function,
ACS Chem. Biol. 7, 552-562 (2012)

2. 学会発表

(国際学会)

実績なし

(国内学会)

- 星野忠次, 柳田浩志, 尾瀨将一, 横田瑞穂, 浦野恵美子, 市川玲子, 村上努, 駒野淳 :
HIV-1 逆転写酵素 RNase H 活性阻害剤の開発、日本薬学第 132 年会, 30E09-pm06、札幌 (2012. 3. 30)

- Hoshino, T. :

In silico maturation of immunoglobulin bound to the cancer-related targets.

The 2nd Japan-China Symposium on Cancer

Research (第 2 回日中がん研究シンポジウム), SS2-1、Chiba (2012. 5. 10)

- Md. Iqbal Mahmood, Saburo Neya, Tyuji Hoshino :

Influence of the membrane lipid composition on the conformation change of G-protein coupled receptor,

Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Tokyo (2012. 10. 16)

- 星野忠次 :

アミロイドβペプチドと GM1 ガングリオシド / コレステロール含有脂質膜との相互作用に関する計算機シミュレーション、

日本ペプチド学会 第 16 回ペプチドフォーラム、京都 (2012. 12. 21)

- Md. Iqbal Mahmood, Xinli Liu, Saburo Neya, Tyuji Hoshino :

Computational study on the effect of the membrane lipid composition on the conformation change of G-protein coupled receptor,

スーパーコンピューターワークショップ 2013、岡崎 (2013. 1. 22)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

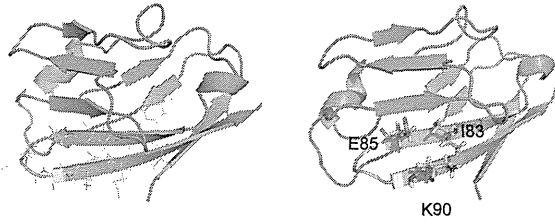


図1：抗原 CD4D1 のモデル構造。Glu85 や Lys90 の周辺が認識部位と予想される。PDB に登録された X 線結晶構造 (2B4C) より作出した。

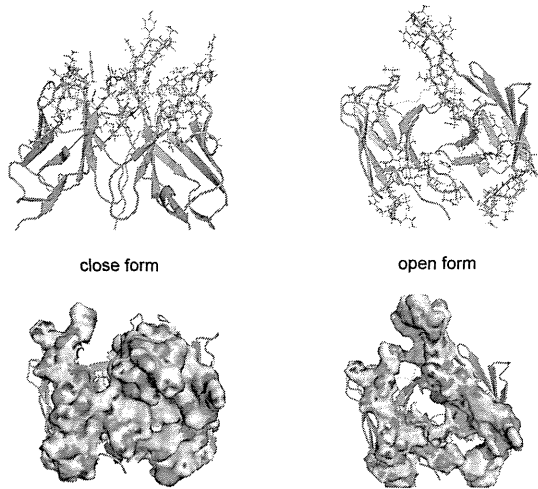
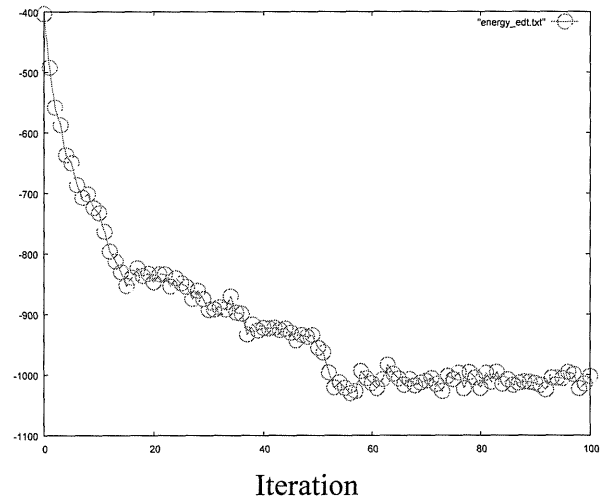


図2：抗体 H0538-213 の scFv のモデル構造。PDB に登録された X 線結晶構造 (3EYF) より作出した。CDR の H3 ループが長い為、これが捻れた形 (左:close form) と伸びた形 (右:open form) の2つを用意した。

CDR	variants	amino residues
L1	213_0	RASQSV-NNYL
	1_37	RASYSD-WNYL
	1_56	RASYSDSWNYW
L2	213_0	DASNRAT
	1_37	DWNYRAT
	1_56	DWNYAT
L3	213_0	QQRGNWPHT
	1_37	QYRGNWKHT
	1_56	QYRGNWKHT
H1	213_0	SYGMH
	1_37	SYEMH
	1_56	DYEMH
H2	213_0	VVSVDGR-TTYYADSVK
	1_37	VFKWDGRWYYYAYDSVK
	1_56	VFKWRNRWYYYAYDSVK
H3	213_0	KDLNKGVCNNGGCYGVD
	1_37	KKWNKAFKNNGGYYGVD
	1_56	KKWRKAFKNNGGYYGVD

図4：抗体成熟化計算における抗体 H0538-213 の scFv と抗原 CD4D1 の結合エネルギーの変化。下表は計算で生じた CDR 部分のアミノ酸変異。

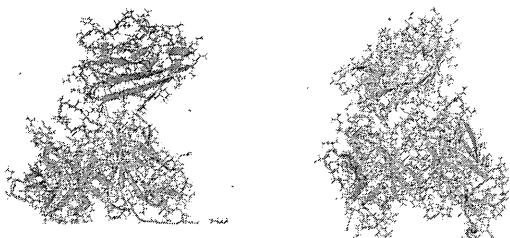
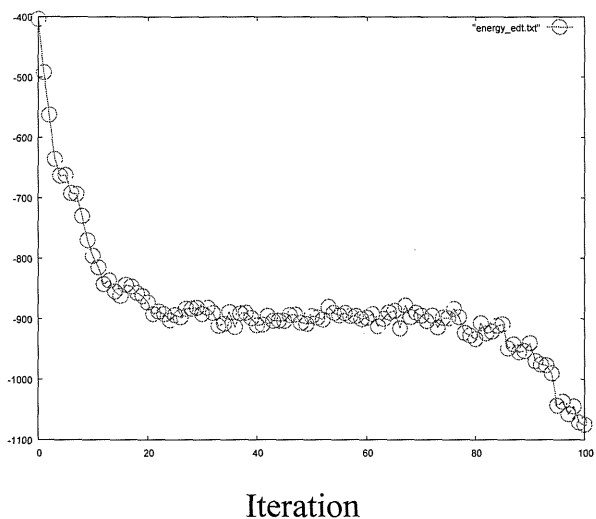


図3：抗体 H0538-213 の scFv と抗原 CD4D1 の結合モデル構造。ループが捻れた形 (左:close form) と伸びた形 (右:open form)。



CDR	variants	amino residues
L1	213_0	RASQSVNNYL
	2_66	RASQSVNND
	2_99	RASQSVNNWL
L2	213_0	DASNRAT
	2_66	LASNRAT
	2_99	LASNRAT
L3	213_0	QQRGN-WPHT
	2_66	QYRGRSWPHT
	2_99	QWRKRSPHT
H1	213_0	SYGMH
	2_66	SYGMH
	2_99	YYAMH
H2	213_0	VVSVDGRRTTYADSVK
	2_66	FVLYDGRRTTYNDSVK
	2_99	FVLYDGRRTTYNRSVK
H3	213_0	KDLNK-GYCNNGGCGVD
	2_66	KRLNKKYYN-IGVCYVD
	2_99	KIWNKKRYNFFGVCYGD

図5：再度行った抗体成熟化計算。上図は結合エネルギーの変化。下表は計算の結果として見られる CDR 部分のアミノ酸変異。

L1	213_0	RASQSV-NNYL
	1_37	RASYSD-WNYL
	1_56	RASYSDSWNYW
	2_66	RASQSV-NNWD
	2_99	RASQSV-NNWL
L2	213_0	DASNRAT
	1_37	DWNYRAT
	1_56	DWNYAT
	2_66	LASNRAT
	2_99	LASNRAT
L3	213_0	QQRGN-WPHT
	1_37	QYRGN-WKHT
	1_56	QYRGN-WKHT
	2_66	QYRGRSWPHT
	2_99	QWRKRSPHT
H1	213_0	SYGMH
	1_37	SYEMH
	1_56	DYEMH
	2_66	SYGMH
	2_99	YYAMH
H2	213_0	VVSVDGR-TTYADSVK
	1_37	VFKWDGRWYYYAYDSVK
	1_56	VFKWRNRWYYYAYDSVK
	2_66	FVLYDGRRTTYNDSVK
	2_99	FVLYDGRRTTYNRSVK
H3	213_0	KDLNKGYCN-NGGCGVD
	1_37	KKWNKAFKN-NGGYGV
	1_56	D
	2_66	KKWRKAFKN-NGGYGV
	2_99	D KRLNKKYYN-IGVCYVD KIWNKKRYNFFGVCYGD

図6：2回の抗体成熟化計算で得られた CDR 部分のアミノ酸変異の比較。

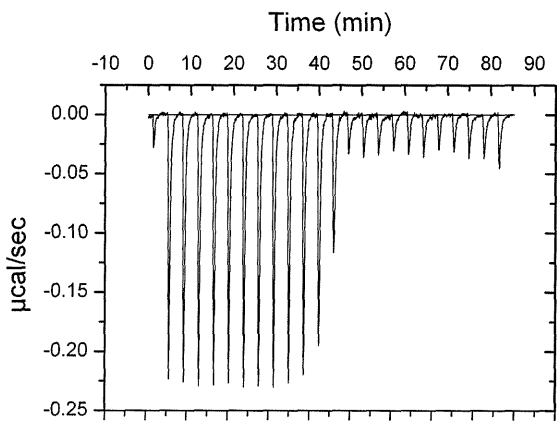
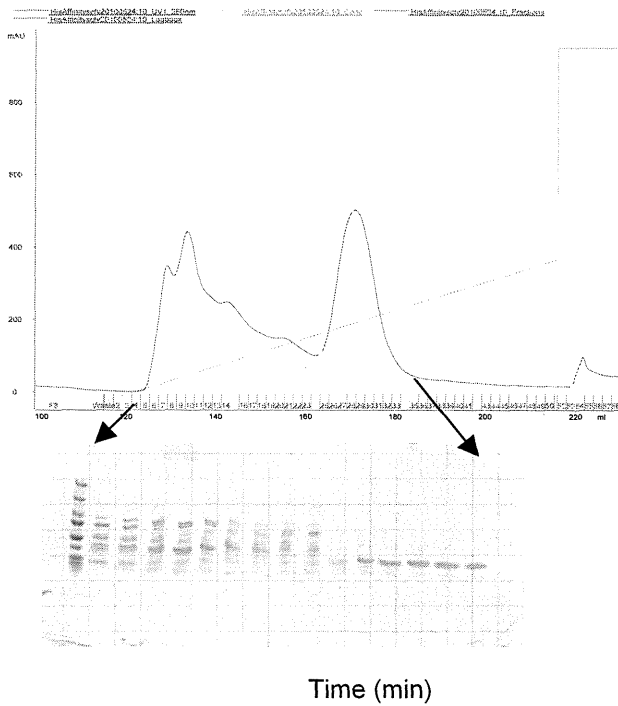


図7：モデル抗体 HyHel-10 の scFv とその抗原である Lysozyme を用いた確認準備実験。(上) HyHel-10 の scFv のモデル。(中) 抗体発現精製の確認。(下) ITC 測定実験での滴定に伴う発熱量のプロファイル。

分担研究課題：ScFv の遺伝的改変と抗原親和性に関する研究

研究分担者 竹腰 正隆 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学・抗体工学 講師

研究要旨 健康なヒトに由来する CD4 反応性抗体クローン H0538-213 は HTLV-1 感染標的である CD4 陽性 T 細胞への安全な治療分子送達法の確立に貢献が期待される。我々が昨年度に抗体工学的に改変した scFv-213 に関して、物理的安定性および反応性の向上とエピトープの同定を行った。詳細な遺伝子解析の結果、H 鎖の CDR2 と CDR3 にそれぞれ 1 個イレギュラーなシステインが存在することが判明した。抗体の安定性や活性に関わることで有り看過できないと判断し、セリンへの置換を行った。セリン改変の結果、物理的安定性は向上した。さらに、CD4 反応性も高まった。大量生産を行うために、最適なベクター・精製系の探索を行った。その結果、T7 系で良好な収量が得られ、Protein A-tag の導入と IgG Sepharose を用いたアフィニティ精製で純度の高い scFv-213 を得る事に成功した。抗体のエピトープを詳細に調べたところ、CD4 のドメイン2に隣接するドメイン1のC端を認識することが明らかになった。しかし、CD4 ドメイン1のMHC class II 分子との相互作用領域を認識するマウス由来モノクローナル抗体 Leu-3a と拮抗しないことから、scFv-213 は CD4 の生理機能を阻害しないことが推測される。これが本抗体クローンが健常人に存在し得た要因と思われる。当初の予定に従っておもな項目は達成できたと考える。

A. 研究目的

HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター開発は本研究の重要な要素である。送達標的細胞は HTLV-1 が主に感染する CD4 陽性 T 細胞と思われる。高い送達特異性と汎用性を達成するため、我々はベクター被覆を2種類の分子で行う技術開発を行う。標的細胞を特異的に認識する分子とベクターと細胞の膜融合を惹起する分子の2種類である。本研究では前者に関する分子開発に焦点を絞る。従前のベクター被覆分子は両活性を併せ持つウイルス膜タンパク質を利用する。例えば、HTLV-1 感染細胞を標的にする場合、HTLV-1 のエンベロープタンパク質は被覆分子として有用と考えられる。しか

し、感染者への応用を鑑みると、感染者に存在する抗体によって十分に機能が発揮できない可能性がある。そこで我々は CD4 陽性 T 細胞を特異的に認識する分子として抗 CD4 抗体を利用する。クローン H0538-213 は健康なヒトボランティアから得られた CD4 を認識する IgM に由来する Fab 抗体である (Hamatake et al. EJI 2010)。本抗体をベクター被覆に供するためには2段階の遺伝的改変プロセスが必要となる。第一段階は scFv 化、第2段階は膜アンカー型分子への改変である。本年度は昨年度作製した scFv-213 について遺伝子分析の結果から遺伝子配列の適正化を行う。適正化の効果が確認できたら、scFv-213 の分析を進めるために大腸菌

を用いた大量生産の系について検討を行う。同時に精製法に関しても検討を行う。得られた scFv-213 を用いて CD4 との反応性についての解析を行うが、特にエピトープ部位の同定が重要となる。CD4 の生理機能を担う部位と異なる部位を認識することを確実に証明したい。

B. 研究方法

scFv-213 の遺伝子配列の適正化: 遺伝子解析の結果、H 鎖 CDR2 と CDR3 に各 1 個イレギュラーなシステインの存在が確認できた。これらの過剰なシステインは予期しない S-S 結合を形成して抗体分子を不安定化させる危険性がある。実際に scFv-213 の濃縮の過程で活性の消失が見られたことからこれらのシステインを他のアミノ酸に置換して安定性を調べる。そのため部位特異的変異導入法を用いてシステインをまずセリンに変える。もしそれで活性に問題があれば他のアミノ酸に変える。Cdon Usage Table によれば大腸菌でのセリンのコドン使用率は以下の頻度である。

UCU	5.7(29)	UCC	5.5(28)
UCA	7.8(40)	UCG	8.0(41)
AGU	7.2(37)	AGC	16.6(85)

従って CDR2 のシステインは TGC であるので AGC に変える。CDR3 のシステインは TGT であるので AGT に変える。どちらも 1 塩基の変換ですむ。CDR2 のシステインを除去するためのプライマー塩基配列は以下の通りである。CDR2F, 5'-AGT TGT CAG CTA TGA TGG AAG AAC TA-3'; CDR2R, 5'-TCA TAG CTG ACA ACT GCC ACC CAC TC-3'。CDR3 のシステインを除去するためのプライマー塩基配列は以下の通りである。CDR3F, 5'-GGT TGA CAG TTG GGG CCA GGG AAC CC-3'; CDR3R, 5'-CCC CAA CTG TCA ACC CCG TAG CAG CC-3'。

T7 ベクター系での生産と精製: 大量生産のために T7 ベクター系の pFN6A に PCR で制限酵素サイトを付加した後にクローニングする。挿入部位として SgfI-PmeI サイトを用いる。クローニング後はシーケンシングによって塩基配列を確認する。得られたベクターは大腸菌 BL21 (DE3) にトランスフォームして生産の条件を調べる。培養温度、培養時間、IPTG 濃度等について検討を行う。精製は His-tag を付加するのでそれに対する精製システムを用いるが、場合によっては他の tag の使用も考える。pFN6A にクローニングするためのプライマー塩基配列は以下の通りである。T7scF, 5'-AAG CGA TCG CCG AAA TTG TGA TGA CG-3' (下線部は SgfI サイト); T7scR, 5'-GCG TTT AAA CTT AAG AAG CGT AGT CCG G-3' (下線部は PmeI サイト)。

CD4 との反応性の検討: まずは反応ドメインの検討を行う。CD4 のドメイン 1 (mD1.1)、ドメイン 1 + 2 (D1D2) (以上、NIH Dr. Dimitrov より供与、Chen W et al, J Virol 2011 を参照)、ドメイン 1 の末端部分 (Fragment 81-92、シグマ社) を等モル用いて ELISA を行い、反応部位を同定する。また同じ抗原を用いて CD4 の生理機能部位を認識するマウス mAb の Leu-3a を用いてコンペティション ELISA を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

抗体遺伝子改変に関してはまず 2 カ所のシステインをセリンに変えたものを作製した。改変前と改変後のクローンについて 2ml の小スケールで培養を行い IPTG 50uM で誘導を行った。その 1.5ml n について scFv-213 の抽出を行い scFv-213 に付けた HA タグに対する 2 次抗体を

用いて ELISA を行ったところ改変後のクローンは吸光値で 3.5 倍の値を示し、活性の増大が確認された。さらに遠心による濃縮を行ったところ活性の低下が認められなかったことから抗体としての安定性が増したことが確認された。以後の実験では改変遺伝子を用いて行った。

次に抗体遺伝子を T7 ベクター系の pFN6A にクローニングし、シークエンスの確認を取った。これを大腸菌 BL21 (DE3) にトランスフォームして 20ml の系での生産を検討した。終夜培養の菌体を培地の 1/100 量加えて 37°C で培養を行い OD600 が 0.3-0.7 に達した時点で IPTG を 0.5mM 加え培養を行い、経時的に大腸菌を 1.5ml ずつ採取した。得られた大腸菌から抗体を抽出し、ELISA で抗体産生量を調べた。

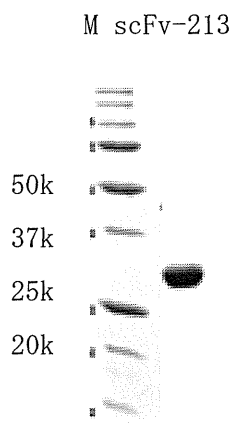
時間	OD450	
	37°C	25°C
0h	0.061	0.053
1h	0.294	0.121
2h	0.164	0.161
3h	0.124	0.224
4h	0.097	0.500
5h	0.101	0.355
6h	0.090	0.337

この結果から 37°C より 25°C で培養するほうが収量が増大することが判明した。また培養時間は 4 時間が最適であった。IPTG に関しては 0.1, 0.5, 1.0mM で検討したところ 0.5mM で収量が最大であった。以後の実験では IPTG 誘導後は 25°C で 4 時間培養、IPTG 濃度は 0.5mM の条件で行った。

次に大量培養した大腸菌から抽出された scFv-213 抗体の精製の検討を行った。当初

scFv-213 の 3' に His-tag を付加したがアフィニティカラムへの吸着は見られなかった。次に 5' 側に His-tag を付加したが同様にアフィニティ精製できなかった。次に 3' 側に ProteinA-tag を付加して産生し、IgG Sepharose で精製の後にプロテアーゼでタグを除去した。SDS-PAGE で検出したのが図 1 である。

図 1. SDS-PAGE 電気泳動像 CBB 染色



タンパク質染色で単一の分子量 30k のバンドとして検出されたことから、精製の確認ができた。これを用いて以下の実験を行った。

CD4 のドメイン 1 (mD1.1)、ドメイン 1 + 2 (D1D2)、ドメイン 1 - 4 (sCD4) に対する反応性を ELISA を用いて調べた。マウス mAb の Leu-3a を陽性対照として用いた。Leu-3a は CD4 ドメイン 1 の生理機能を担う MHC class II 分子相互作用部位を認識するマウスモノクローナル抗体である。抗原はモル濃度を同じにした。結果は sCD4 に対する値を 100 % として表示した。

	Leu3a	scFv-213
sCD4	100 %	100 %
D1D2	78 %	68 %
mD1.1 (D1)	78 %	53 %