

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 (図 1 参照)。

3) ATL 移植マウスを用いた治療評価系の構築

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、LTR 認識 ZFN が ATL の治療分子として有用である事を示唆している (Leukemia, 2013)。

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

- 論文発表
1. Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Matsuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, Oike Y. Serum ANGPTL2 Levels Reflect Clinical Features of Breast Cancer Patients: Implications for The Pathogenesis of Breast Cancer Metastasis. *Int J Biol Markers* in press
2. Kojima Y, Hagiwara S, Uehira T, Ajisawa A, Kitanaka A, Tanuma J, Okada S, Nagai H. Clinical Outcomes of AIDS-related Burkitt Lymphoma: A Multi-Institution in Japan. *Jpn J Clin Oncol* in press
3. Puthdee N, *Vaeteewoottacharn K, Seubwai W, Wonkchalee O, Keawkong W, Juasook A, Pinloar S, Pairojkul C, Wongkham C, Okada S, Boonmars T, Wongkham S. Establishment of an Allo-Transplantable Hamster Cholangiocarcinoma Cell Line and Its Application for In Vivo Screening of Anti-cancer Drugs. *Korean J Parasitol* 51(6):711-717, 2013
4. Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, *Katano H. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO Classification of Lymphomas, fourth edition. *Cancer Med* in press
5. Vaeteewoottacharn K, Michai M, Srikoon P, Hattori S, Kariya R, Matsuda K, Wongkuham S, and *Okada S. Potent reactive oxygen species JNK-p38 activation by sodium salicylate potentiates death of primary effusion lymphoma cells. *Anticancer Res* in press
6. *Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, and Kelleher AD. Promoter targeting shRNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2:e137, 2013
7. Motoyama K, Onodera R, Okamatsu A, Higashi T, Kariya R, Okada S, and *Arima H. Potential use of the complex of doxorubicin with folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin for tumor-selective cancer chemotherapy. *J Drug Target* in press
8. Chen J, Zhao R, Semba U, Oda M, Suzuki T, Toba K, Hattori S, Okada S, and *Yamamoto T. Involvement of cross-linked ribosomal protein S19 oligomers and C5a receptor in definitive erythropoiesis. *Exp Mol Pathol* 95(3):364-375, 2013
9. Kariya R, Taura M, Suzu S, Kai H, Katano, and *Okada S. HIV protease inhibitor Lopinavir induces apoptosis of primary effusion lymphoma cells via suppression of NF- κ B pathway. *Cancer Lett* 342(1):52-59, 2014
10. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki

- T, Amano M, Suico MA, Kai H, Mitsuya H, and *Okada S. Comparative analysis of ER stress response by HIV protease inhibitors: Lopinavir but not Darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. *Free Radic Biol Med* 65C:778-788, 2013
11. Srikoon P, Kariya R, Kudo E, Goto H, Vaeteewoottacharn K, Taura M, Wongkham S, and *Okada S. Diethyldithiocarbamate suppress NF- κ B dependent metastatic pathway in cholangiocarcinoma cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(7);4441-4446, 2013
 12. Vaeteewoottacharn K, Kariya R, Matsuda K, Taura M, Wongkham C, Wongkham S, and *Okada S. Perturbation of proteasome function by bortezomib leading to ER stress induced apoptotic cell death in cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(9);1551-1562, 2013
 13. Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Kuwahara K, Narimatsu Y, Sawaki H, Narimatsu H, Okada S, Sakaguchi N, Wongkham S. CA-S27: A novel Lewis A associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 104(10):1278-1284, 2013
 14. Onodera R, Motoyama K, Okamatsu A, Higashi T, Kariya R, Okada S, and Arima H. Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm* 452(1-2):116-123, 2013
 15. Ohsugi T, Ishida T, Shimasaki T, Okada S, and Umezawa K. p53 dysfunction precedes the activation of nuclear factor- κ B during disease progression in mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein. *Carcinogenesis* 34(9):2129-2136, 2013
 16. Goto H, Kojima Y, Nagai H, and *Okada S. Establishment of a CD4-positive cell line from an AIDS-related primary effusion lymphoma. *Int J Hematol*, 97(5);624-633, 2013
 17. Nakamura T, Aizawa T, Kariya R, Okada S, Demura M, Kawano K, Makabe K, and *Kuwajima K. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of HAMLET and other protein-oleic acid complexes. *J Biol Chem* 288(20):14408-14416, 2013
 18. Suzu I, Goto H, Hiwatashi N, Hattori S, Rotjanapan K, Leeanansaksiri W, and *Okada S. Antioxidant and Antityrosinase Activity of *Cissus quadrangularis* Extract. *Nat Prod Commun* 8(5):629-630, 2013
 19. Tanaka A, Takeda S, Kariya R, Matsuda K, Urano E, Okada S, and *Komano J. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus. *Leukemia* 27(8);1621-1627, 2013
 20. Goto H, Matsuda K, Srikoon P, Kariya R, Hattori S, Taura M, Katano H, and *Okada S. Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced V γ 9V δ 2 T cells against primary effusion lymphoma. *Cancer Lett* 331(2):174-182, 2013
 21. 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

2. 学会発表
(国際学会)

1. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Kouki Matsuda, Eriko Kudo, Seiji Okada. Targeting CD47-SIRPA for the controlling malignant effusion in primary effusion lymphoma. International Society for Hematology and Stem Cells 42nd Annual Scientific Meeting, The Imperial Riding School Renaissance Hotel, Vienna, Austria, 22-25 August 2013.
2. Hiroki Goto, Eriko Kudo, Kouki Matsuda, Ryusho Kariya, Manabu Taura, Seiji Okada. Evaluation of Targeting CD47-SIRPa using primary effusion lymphoma xenograft mouse model. 2013 ASH Annual Meeting and Exposition Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, U.S., December 7-10 2013
3. Manabu Taura, Eriko Kudo, Hiroki Goto, Seiji Okada. The role of HIV-1 restriction factor Murr1 in HIV-1 latently infected cells. 2013 ASCB Annual Meeting Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, U.S., December 14-18 2013
4. Kulthida Vaeteewoottacharn, Ryusho Kariya, Sawako Fujikawa, Sopit Wongkham, Seiji Okada. Inhibition of CD47 signaling alleviates tumor growth and metastasis of cholangiocarcinoma. The 4th International Symposium on Carcinogenic Viral Infection, Immunity, and Cancer Keio Plaza Hotel Sapporo, Sapporo, February 10-11 2014
5. Kouki Matsuda, Shinihiro Hattori, Ryusho Kariya, Eriko Kudo, Hiroki Goto, Manabu Taura, Seiji Okada. Inhibition of HIV-1 entry by a tricyclic coumarin GUT-70. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. HIV Pathogenesis Virus vs. Host (X4), Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada March 9-14 2014

(国内学会)

1. 松田幸樹、服部真一朗、刈谷龍昇、古水雄志、工藤恵理子、木村晋也、上岡隆一、岡田誠治. 三環系クマリン GUT-70 による HIV-1 侵入抑制効果. 第 23 回日本サイトメトリー学会、日本医科大学、東京、2013 年 6 月 22-23 日
2. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Kouki Matuda, Eriko Kudo, Kazuhiro Kuwahara, Harutaka Katano, Seiji Okada. Targeting CD47-SIRPA for the controlling malignant effusion in primary effusion lymphoma. 原発性滲出性リンパ腫の体液貯留形成に対する CD47-SIRPA を標的とした治療. 第 75 回日本血液学会集会 ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館、札幌、2013 年 10 月 11-13 日
3. 工藤恵理子、田浦学、後藤裕樹、岡田誠治. HIV-1 抑制因子 Murr1 は HIV-1 潜伏感染細胞において Toll-like Receptor シグナルを抑制する. 第 61 回日本ウイルス学会、神戸国際会議場、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
4. 後藤裕樹、田浦学、工藤恵理子、松田幸樹、刈谷龍昇、片野晴隆、岡田誠治. IL-6 を介した Primary effusion lymphoma の体液貯留形成. 第 61 回日本ウイルス学会、神戸国際会議場、神戸、2013 年 11 月 10-12 日
5. 後藤裕樹、田浦学、工藤恵理子、松田幸樹、刈谷龍昇、片野晴隆、岡田誠治. Primary effusion lymphoma の体液貯留形成における

IL-6 の役割 第 27 回日本エイズ学会、熊本市市民会館崇城大学ホール・熊本市国際交流会館、熊本、2013 年 11 月 20-22 日

6. 刈谷龍昇、松田幸樹、中村敬、古水雄志、鈴木元、桑島邦博、上岡龍一、岡田誠治. HAMLET/BAMLET の原発性滲出性悪性リンパ腫に対する抗腫瘍効果. 第 27 回日本エイズ学会、熊本市市民会館崇城大学ホール・熊本市国際交流会館、熊本、2013 年 11 月 20-22 日
7. 松田幸樹、服部真一郎、刈谷龍昇、古水雄志、工藤恵理子、後藤裕樹、田浦学、木村晋也、上岡龍一、岡田誠治. 三環系クマリン化合物 GUT-70 の HIV-1 侵入抑制効果. 第 27 回日本エイズ学会、熊本市市民会館崇城大学ホール・熊本市国際交流会館、熊本、2013 年 11 月 20-22 日
8. 工藤恵理子、田浦学、松田幸樹、嶋本雅子、刈谷龍昇、後藤裕樹、服部真一郎、木村晋也、岡田誠治. 新規天然有機化合物(GUT-70) による HIV-1 増殖抑制効果. 第 27 回日本エイズ学会、熊本市市民会館崇城大学ホール・熊本市国際交流会館、熊本、2013 年 11 月 20-22 日
9. 田浦学、工藤恵理子、後藤裕樹、岡田誠治. HIV-1 潜伏感染細胞における HIV-1 抑制因子 Murr1 の役割. 第 27 回日本エイズ学会、熊本市市民会館崇城大学ホール・熊本市国際交流会館、熊本、2013 年 11 月 20-22 日
10. Manabu Taura, Eriko Kudo, Seiji Okada. The role of HIV-1 restriction factor Murr1 in HIV-1 latently infected cells. 第 42 回日本免疫学会、幕張メッセ、千葉、2013 年 12 月 11-13 日

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

む)

1. 特許取得

腫瘍細胞選択的抗がん剤(特願2013-106793)、2013年5月21日、有馬英俊、本山敬一、東大志、岡田誠治

2. 実用新案登録

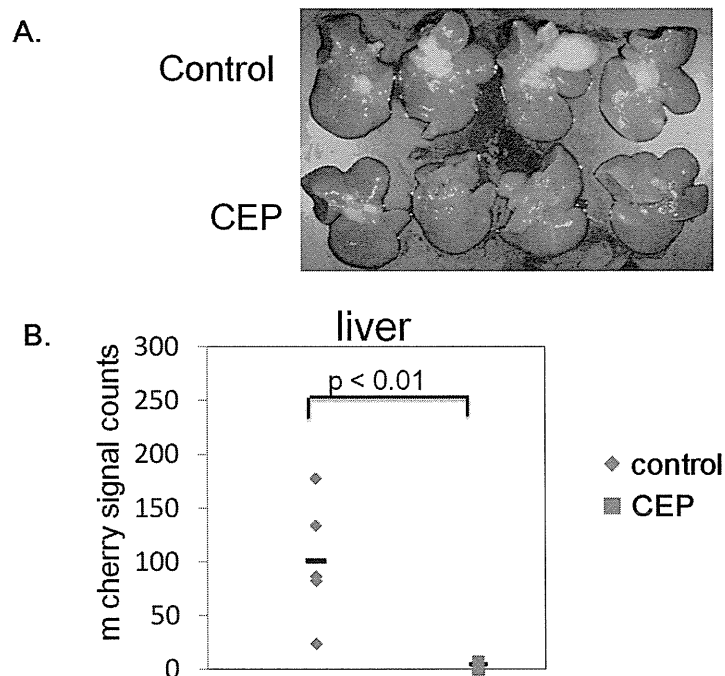
特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

図1. 蛍光標識した ATL 細胞の定量的検出とセファランチン(CEP)の抗 ATL 効果の検討

高度免疫不全マウス (NOJ マウス) 腹腔内に ATL 細胞株(MT-2)を移植した。移植後1週間後からセファランチン(20 mg/kg/day)を4週間連日腹腔内投与後、肝臓に生着した ATL 細胞を蛍光イメージング装置(Maestro)により定量的解析を行った。A. 肝臓に生着した ATL 細胞、B. 肝臓に生着した ATL 細胞の蛍光シグナルを定量したところ、CEP 投与群では明らかな蛍光シグナルの減量が認められた。



分担研究課題：In silico maturation 法に基づく抗原-抗体の親和性改善について

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、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、CD4 との結合親和性を向上させるための研究を行う。親和性向上を実現するためには、幾つかの変異型 H0538-213 抗体を作出して、CD4 との結合解離定数等を計測する必要がある。このために CD4 ならびに H0538-213 抗体を大腸菌で発現させて、精製後に物理化学的測定を実施することを計画した。発現精製により CD4 の部分構造である CD4D1 ドメインならびに H0538-213 抗体の一本鎖 Fv 領域(scFv)の両者を得ることができた。また H0538-213 scFv 抗体の CD4D1 に対する結合親和性を計測することができた。さらにコンピューター内で抗体を成熟させる計算を実行した。この計算結果に基づいて、H0538-213 scFv の抗体改変を試みている。

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 抗原ならびに抗体の発現精製

抗原 CD4 は、D1, D2, D3, D4 の 4 つのドメインを持つ。このうち CD4D1 部分構造のみを発現させることとした。塩基配列を pET50 (b) (Novagen) に導入し、大腸菌 Rosetta で発現させる。大腸菌培養中に OD 値が 0.6 になった時点で、0.4mM IPTG を投入して、発現を誘導する。IPTG 投入後、30℃ で一晚培養する。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、上清より 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。

scFv 抗体 H0538-213 は、発現配列を pGEX-6P-2 (GE health care) 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、20℃ 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、上清を GST カラムに導入する。GST カラム内に HRV3C 酵素を封入してカラム内で GST タグを切断する。この後、還元グルタチオンを含まないバッファーで溶出して、精製された scFv を得る。

B-2 結合親和性確認実験

精製された抗原 CD4D1 および精製した抗体 scFv のサンプルを用いて、光干渉法によって結合定数の算出を行った。CD4D1 をセンサーチップ表面にアミノカップリングで固定する。このチップを抗体分子の入った溶液に浸して、抗体分子の結合量をモニターする。一定時間後に、抗体分子の入っていない溶液に浸して、解離による結合量の減少を計測する。結合量の増減のプロファイルから、H0538-213 scFv 抗体と抗原 CD4D1 の結合定数を求めることができる。

等温滴定熱量計 (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。精製した抗原 CD4D1 と H0538-213 scFv 抗体の両者を、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℃ に設定する。

B-3 抗体成熟計算

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 アミノ酸残基が、H0538-213 抗体の反応部位であると推察される。抗体 H0538-213 は、CDR の H3 配列に特徴がある。ヒトの Fab 構造に関

するPDB中の凡そ600件ほどの構造データから、X線結晶構造 (PDB#3EYF) が最も抗体H0538-213に近いと判断し、3EYF結晶構造を雛形にして抗体の計算構造を構築した。

ZDOCKを用いて、抗原CD4D1と抗体H0538-213の結合構造を10個程度、予測算出した。絞られた10個程度の結合構造に対して、分子動力学計算を実行して、安定な結合構造を算出した。目視により最も適切な抗原-抗体の複合体構造を選んだ上で、抗体の成熟を計算機上で自動的に行う*in silico* maturationプログラムを実行した。本プログラムでは、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、変異を導入抗体と標的抗原との結合親和性を評価して、より親和性が向上する変異を探索できる。このソフトウェアにより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。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

C-1 抗原ならびに抗体の発現精製

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。抗体 H0538-213 の scFv は、可溶性画分への発現量は多くはないが、GST カラム内で HRV-3C 酵素を用いてタグから切断する方法により、活性のある H0538-213 scFv 抗体が得られた。こちらにも研究分担者の竹腰による ELISA 試験で、抗原に反応

することが確認されている。

両者の精製後の SDS-PAGE の結果を、図 1 に示す。抗原 CD4D1 では 1.2k の分子量に、H0538-213 scFv 抗体では 2.8k の分子量に、単一のバンドが確認できる。SDS-PAGE は、*oriol*e 蛍光ゲル染色であり、CBB 染色よりも感度が高い。従って、他の夾雑タンパク質がほとんど混在していないことが判る。

C-2 結合親和性確認実験

抗原 CD4D1 をセンサーチップにアミノカップリングで固定し、これに抗体 H0538-213 scFv を結合させるようにして、Octet (ForteBio) の機器を用いて、干渉法により抗体の結合量変化を測定した。測定中におけるシグナル変化を図 2 (a) に示す。センサーチップに CD4D1 の N 末が付くにつれて、シグナルが上昇する。これはチップ上に抗原 CD4D1 が固定化されたことを意味している。次に、溶液処理により CD4D1 の固定化反応を終了した後に、抗体 H0538-213 scFv の入った溶液にセンサーチップを浸す。抗体 H0538-213 scFv が CD4D1 に結合して、シグナルが上昇する。抗体 H0538-213 scFv の入っていない溶液にセンサーチップを浸すと、CD4D1 から抗体が解離してシグナルが減少する。抗体 H0538-213 scFv の濃度を、 $8\mu\text{M}$ 、 $4\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.25\mu\text{M}$ 、 $0.125\mu\text{M}$ 、 $0\mu\text{M}$ で変化させて行ったが、濃度依存的に吸着量に変化している。図 2 (b) に各濃度での吸着量を比較した。この吸着量の変化から、結合解離定数は、 $K_d = 1.2 \times 10^{-7}$ と算出された。各抗体濃度の最大結合量の違いからは、定常状態解析という手法で、やはり結合解離定数を算出することができる (図 2 (c))。こちらからも結合解離定数は、 $K_d = 1.2 \times 10^{-7}$ と算出された。

C-3 抗体成熟計算

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。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。ドッキングシミュレーションプログラム (ZDOCK) で得られた構造をもとに、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結合構造を選び出した (図 3)。

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。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。変異の導入におけるアミノ酸変異の選択には、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。そこで同じ初期構造を使って、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。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 4)。その結果、以下の結果を得た。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である。CDR の H2 で、1, 2 番目に無極性の芳香環の存在が有利である。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 (図 4)。

D. 考察

抗体 H0538-213 scFv は、大腸菌での発現量が

不十分で、かつ精製しても活性の確認できないタンパク質しか取れないことが問題であった。モデル実験でしばしば使用される抗体の中には、Lysozyme に対する HyHel-10 抗体や、MUC-1 に対する SM3 抗体がある。これらの scFv 発現精製には成功している。この時は、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。一方で、抗体 H0538-213 scFv は、pET21 (b) ベクターでは、培養温度や培養に用いる大腸菌の種類を変えても、可溶性画分からは目的の抗体分子はほとんど得られなかった。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かった。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ところ、発現精製の温度条件ならびに培養時間等の検討を行い、少し可溶性画分に発現が観察された。しかし通常の還元グルタチオンを使用する方法で、GST カラムから溶出したところ、抗体の抗原認識の活性は大きく低下していた。これは還元グルタチオンを使用することで、抗体のジスルフィド結合が切断されてしまうためと判断した、そこで GST カラムに吸着している段階で、GST-tag 融合部位を HRV3C 酵素で切断する方法で溶出させたところ、活性のある抗体タンパク質が得られた。

H0538-213 に関しては、抗体の scFv が安定でないために、大腸菌での発現量や活性の保持が難しいことが懸念された。そこで H0538-213 に関して、Fab も作成して GST-tag を持つ pGEX-6p-2 ベクターでの発現精製も行った。GST カラムから、通常の還元グルタチオンを使用す

る方法で溶出したところ、抗体の抗原認識の活性は大きく低下していた。従って、H0538-213 に関しては、ジスルフィド結合の保持のための条件が極めて重要になると判断した。

抗体 H0538-213 は、CDR の H3 配列に大きな特徴がある。H3 は比較的長い 17 アミノ酸残基の配列を持ち、Cys を 2 つも含んでいる。通常、抗体の Heavy chain と Light chain がジスルフィド結合で結びつくために、CDR には Cys が含まれないことがほとんどである。実際に、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。最も類似した X 線結晶解析構造は、PDB#3EYF であった。この構造をもとに、抗体 H0538-213 の三次元構造を予測して、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。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、抗原との共結晶化を試みて構造情報を得ると同時に、予測変異の精度向上を進める。

E. 結論

抗体 H0538-213 の scFv ならびに抗原 CD4D1 の両者を大腸菌で発現して、2 つのタンパク質の結合親和性を計測した。抗体 scFv タンパクの発現と精製方法を検討した。特に精製に関して、GST カラム内で HRV3C 酵素で切断することにより、活性のある抗体分子を溶出できる方法を確立した。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須であるが、精製した抗体が十分量得られれば、実験は効率よく進めるこ

とができる。また抗体 H0538-213 と抗原 CD4D1 との共結晶化も可能となり、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

Md. Iqbal Mahmood, Xinli Liu, Saburo Neya, T. Hoshino :
Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor,
Chem. Pharm. Bull. 61(4), 426-437 (2013)

T. Hoshino, Md. I. Mahmood, K. Mori, K. Matsuzaki :
Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid β -Peptides Onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane,
J. Phys. Chem. B 117(27), 8085- 8094 (2013).

2. 学会発表

(国際学会)
実績なし
(国内学会)

• 星野忠次 :

Computational study on the aggregation and assemble process of amyloid beta proteins,
日本生物物理学会 第 51 回年会、3SEA-03、
京都(2013. 10. 30)

• 星野忠次、イハル マハムド :

G タンパク質共役型受容体の構造安定性への脂質膜組成の影響に関するシミュレーション解析、
第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、A-02, 東京(2013. 11. 21)

• 星野忠次 :

2 価金属原子対を標的とした抗ウイルス薬
の開発

感染症研究グローバルネットワークフォー
ラム 2013、 千葉(2013. 11. 30)

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

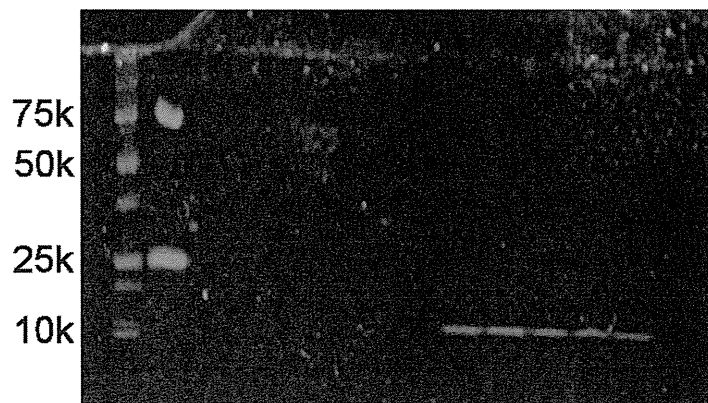
2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

(a) CD4D1



(b) HO538-213 scFv

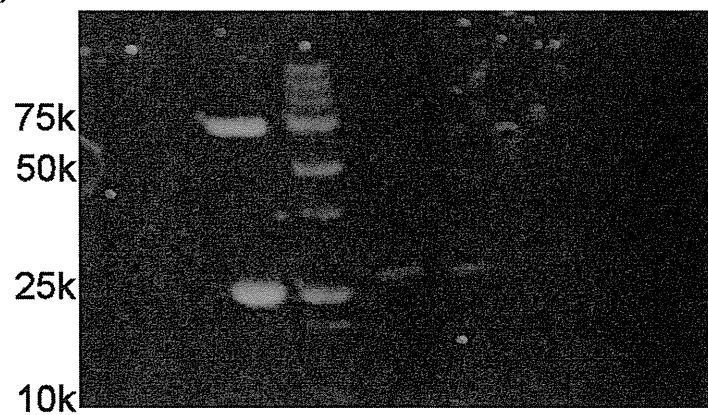


図 1 : 抗原 CD4D1 と抗体 HO538-213 の scFv の大腸菌による発現精製後のゲル泳動図。

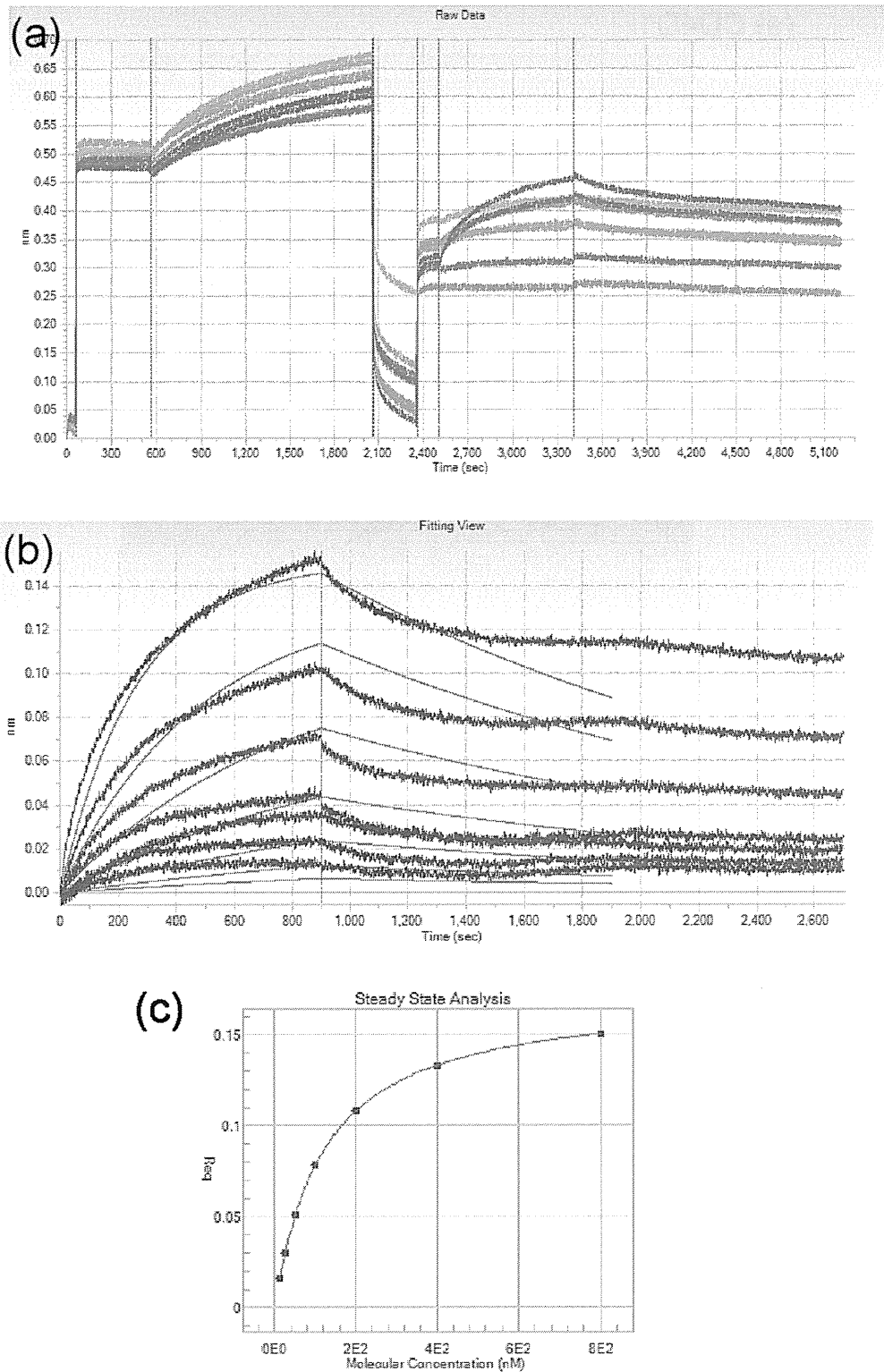


図 2 : 抗原 CD4D1 と抗体 H0538-213 scFv の結合親和性評価。(a) 抗原 CD4D1 を固体化したセンサーチップと抗体 H0538-213 scFv との相互作用によるシグナル変化。(b) 各濃度における(a)のシグナルの比較。(c) 定常状態解析による結合解離定数の算出。

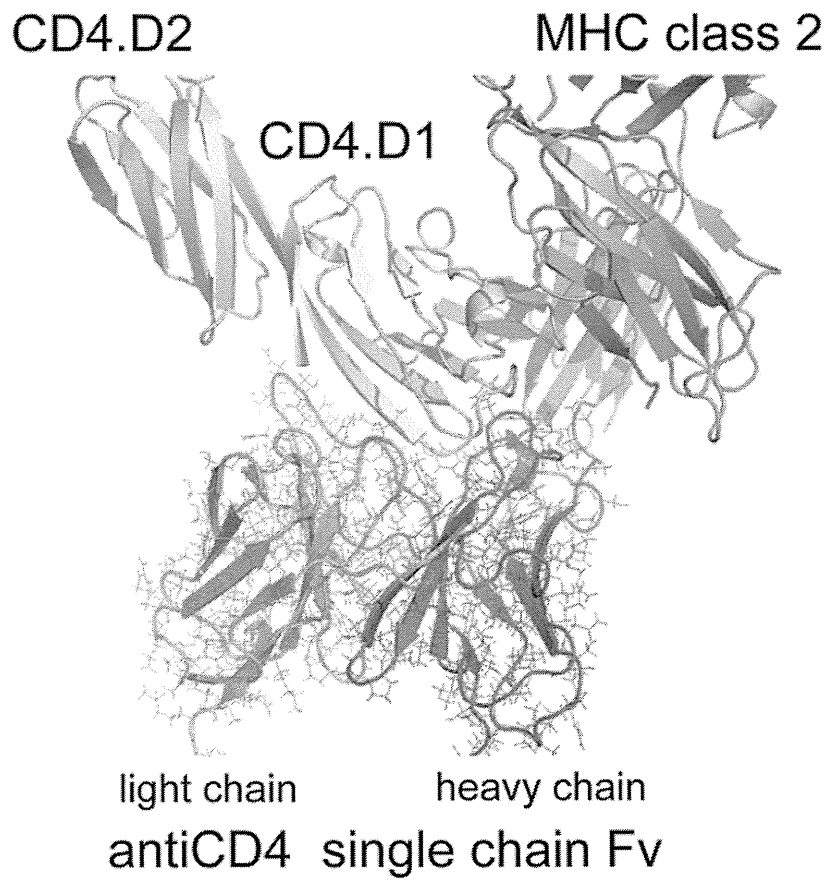


図3：抗原 CD4D1 と抗体 H0538-213 scFv の結合予測構造。抗原 CD4D1 のループ部分が抗体により捕捉されている。CD4 と MHC との相互作用の位置も比較のため示した。抗体 H0538-213 と相互作用する位置が異なる。

L1	213_org	R A S Q S V N N Y L
L2	213_org	D A S N R A T
L3	213_org 213_mut	Q Q R G N W P H T Q Y R G N W K H T
H1	213_org	S Y G M H
H2	213_org	V V S Y D G R T T Y Y A D S V K V F S Y D G R T T Y Y A D S V K
H3	213_org 213_mut	K D L N K G Y C N N G G C Y G V D K K W N K A G Y N N G G Y Y G V D

図4：結合親和性向上が期待される H0538-213 scFv 抗体へのアミノ酸残基の変異導入の例。太字で変異候補のアミノ酸を示す。

平成25年度 厚生労働科学省研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発」

課題番号：H23-新興-一般-028

分担研究報告書

分担研究課題：抗体工学による哺乳類細胞膜局在型の単鎖抗体の作出

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 HO538-213 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、哺乳類細胞の表面に発現するよう遺伝的改変を加えた。2 種の膜アンカーモチーフを用いて細胞表面に提示させたところ GPI アンカーを用いた系において効率よく提示されることが判明した。ヒトモノクローナル抗体を scFv 化して GPI アンカーを利用して哺乳類細胞の細胞表面に発現させたのは世界初である。顕微鏡およびフローサイトメトリーにより、scFv-213 が哺乳類細胞の表面に提示されていることが示された。細胞表面上で scFv-213 と抗原抗体反応を行う CD4-GFP 及び対照となる GFP に関しても安定発現系での発現系を樹立した。ただ CD4-GFP の精製効率は低く、CD4 と GFP 間のスペーサーの調整が必要と思われる。scFv-213 と CD4-GFP が相互作用する予備的データが得られた。このことは我々の構築したシステムが実査の治療に有用であることを示す物で、今後の研究進展が期待できる。

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 HO538-213 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 について膜結合ドメインを付加して哺乳類細胞の表面への提示を試みる。同時にその反応相手である CD4 についても GFP を付加しての産生を試みる。両者が完成したら細胞表

面での抗原抗体反応成立することを証明したい。

B. 研究方法

scFv を哺乳類細胞の表面に提示するアンカーとして 2 種類を考慮した。1 つめは PDGF リセプターの膜貫通ドメインを融合させる方法で、これを持つ市販ベクター pDisplay (Life Technology 社) にクローニングすることで達成される。もう 1 つは細胞表面のラフトに提示をする TNSALP の C 末端に存在する GPI アンカーシグナルを利用する方法で、このために以下のオリゴヌクレオチド対を合成する (上段がヌクレオチド、下段がアミノ酸)。

AGCTCGGCAGGCAGCCTTGCTGCAGGC

S S A G S L A A G

CCCCTGCTGCTCGCTCTGGCCCTCTAC

P L L L A L A L Y

CCCCTGAGCGTCCTGTTCTGA

P L S V L F *

この配列を scFv の 3' 側に付加するように設計する。この 2 番目のセリンにアンカーが付加される。また scFv の 5' 側にはどちらの構築物にも Igk chain の N 末端にある leader sequence と HA-tag が付加され、合成されたタンパク質の ER への移行と組換え体の発現確認に使用する。作製したコンストラクトは CHO 細胞にトランスフェクトして G418 による選択により安定発現系を樹立する。そのために発現細胞は抗 HA 抗体及び 2 次抗体で染色し、フローサイトメトリーで細胞クローンの選択と発現量の評価を行う。

一方、抗原側となる CD4 に関して ORF の C 末端をどこまで発現させるか検討した結果、細胞外ドメインの 1216 塩基までをクローニング

して発現を試みることにした。培養細胞系の分泌型と非分泌型の両方のベクターで検討を行う。対照として GFP のみを発現させた物を使用する。分泌系ベクターとしては pSecTag2 を非分泌系ベクターとしては pCDNA3.3 を用いる。産生された CD4-GFP と GFP は GFP-Trap_M Kit (Chromo Tek) を用いて精製する。これは磁気ビーズに抗 GFP 抗体が結合されたものである。得られた CD4-GFP と GFP はエッペンチューブ中で scFv 発現細胞と対照の CHO 細胞と抗原抗体反応を行い、結合した GFP を分光蛍光光度計で測定する。その際、細胞に Hoechst33258 を加えて核染色を行い、細胞数の補正を行う。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

scFv-213 を哺乳類細胞の形質膜表面に提示する 2 種類のコンストラクトに関して CHO 細胞にトランスフェクトした。G418 でセレクションをかけて約 10 日後に抗 HA-FITC 抗体で染色し FACS で陽性細胞を解析し、ソーターを利用してシングルセルアイソレーションを行った。解析の結果、PDGF リセプターの膜貫通ドメインを利用したものより、GPI アンカーを利用したコンストラクトの方が細胞あたりの発現量が約 2 倍高いことが分かったので、以後は GPI アンカーを用いて実験を行った。

シングルアイソレーションしたいくつかの細胞クローンについて、再度 FACS を行い、安定発現系をセレクションした。得られた細胞について HA-tag を anti-HA monoclonal antibody conjugated with Alexa 594 (Molecular Probe) で染色し、核を Hoechst33258 染色した共焦点レーザー顕微鏡

の写真を示す。蛍光シグナルが細胞周囲に位置していることから scFv-213 も細胞の表面に提示されていると考えられる (図 1 参照)。同様の結果は anti-HA monoclonal antibody conjugated with FITC (Roche)を用いた免疫染色にても得る事が出来た。

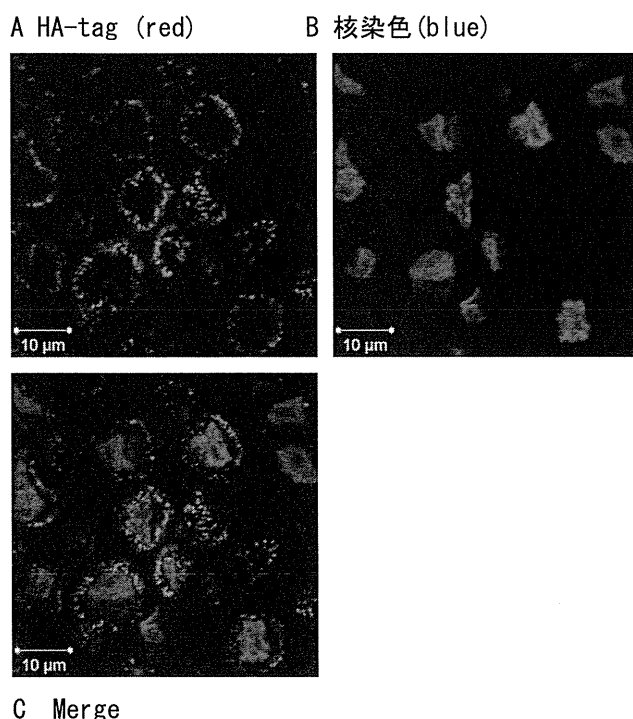


図 1. GPI アンカー型 scFv-213 の CHO 細胞における発現局在

次に CD4-GFP と GFP の産生を行った。当初、分泌型ベクターの pSecTag2 にクローニングして一過性発現系の FreeStyle システム (Life Technology) を採用した。トランスフェクション 1 週間後の培養上清を回収して上清中の GFP を測定したところ、ほとんど産生されていないことが判明した。そこでベクターを分泌型ではない pCDNA3.1 に変え、安定発現系を求めて CHO 細胞にトランスフェクトした。G418 でセクションして 3 週間後に FACS で GFP 産生細胞を分離し、緑色蛍光シグナル強度の強い細胞をソーターを利用してシングルセルア

イソレーションした。GFP 単独の物に比べて CD4-GFP 複合体ではシグナル強度が弱く、また陽性細胞数も半数程度で、CD4-GFP 産生に細胞に負荷がかかると思われた。アイソレーション後に増殖した細胞を用いて GFP の強度と Hoechst33258 染色の強度を測定して、単位細胞あたりの GFP の強度が高い細胞クローンを選抜した。それらを増やして 10 センチシャーレ 2-5 枚分の細胞を用いて得た資料から GFP タグを capture するタンパク質精製を検討した。

蛍光を指標とする蛍光タンパク質の精製

	CD4-GFP*	GFP*
細胞抽出液	8565	18906
カラムに非吸着	7030	13134
溶出	0	24932

*値は緑色蛍光の相対値 (relative fluorescence unit) を示す。

GFP の精製は良好に作動したが、CD4-GFP の精製効率率は極めて低かった。複数回の試行でも再現性よく低い精製効率が示された。そこで暫定的にカラムに非吸着画分を用いて CHO 細胞の表面に提示している scFv-213 との反応性について検討を行った。対照に GFP 単独を用い、それぞれ細胞に添加して洗浄した後の緑色蛍光を定量した。結果は得られた GFP の蛍光強度を細胞数を表す Hoechst33258 染色の蛍光強度で補正した。

細胞に吸着したと思われる GFP 蛍光強度

細胞の種類	加えたタンパク質		CD4+GFP/GFP
	CD4-GFP	GFP	
CHO+scFv-213	1.167	0.985	1.185
CHO	0.936	0.868	1.078

CD4-GFPを加えたCHO+scFv-213のみ高い緑色蛍光が観察された。以上の結果より細胞に提示されたscFv-213とCD4が抗原抗体反応を行っている可能性が示唆された。

D. 考察

ベクターを抗体で被覆する事により、遺伝子を特定の細胞に送達する技術は各種開発されている。抗体は操作性を考え、多くの場合がscFvに改変されたもので、アデノウイルスベクターのspikeに結合させたり、エンベロープタンパク質の機能を阻害しな場所に融合させる等の工夫がなされてきた。本研究では、融合タンパク質ではなく、scFvを単独でエンベロープに取り込ませる方法を用いる点でユニークな試みである。この背景には pseudotyping 技術の進展から、細胞質ドメインを持たない分子がエンベロープウイルスを被覆できる知見が集積した事があげられる。これまで多くの scFv が試験されてきた中で、ヒトモノクローナル抗体に根ざした開発であること、GPI アンカー型改変によりベクター被覆をするアプローチは我々の独自のものである。これまで技術的に検証された事がないヒトモノクローナル抗体の scFv-GPI 型が、ほ乳類細胞の形質膜に発現させたのは世界で初めてと思われる。

抗体の改変はしばしば反応性と安定性に負の影響を与える。従って、GPI アンカー型の抗体が抗原と反応を維持するかを検討することは極めて重要なステップである。今回の研究においては、結合を証明するためのツールとして精製 CD4 抗原を GFP 融合タンパク質として利用することを試みた。これは、今後 scFv を改良する際に、繰り返し反応性の検討を行うための実験系として有用だからである。今回使用した GFP 融合タンパク質の精製キットは抗 GFP

抗体を利用したものであるが、CD4-GFP では CD4 が立体障害となって抗 GFP 抗体のエピトープが認識されない可能性が示唆された。異なる GFP 抗体を利用するか、CD4 と GFP の間により長いリンカーを挿入してこの問題を回避する必要があると思われる。また、今回の検証では S/N 比が低かったが、これは粗精製標品を抗原として利用したためである。粗抽出液には detergent や細胞に対する toxic material を含んでいるため、実験がこれらの影響を受けないようにするために標品を稀釈した後に実験を行ったことに起因すると思われる。この点についても精製法の改善により解決できると思われる。

総じて、当初の計画に従って scFv をベクター被覆用の抗体に改変することについては達成できたと考える。

E. 結論

HTLV-1 感染症の治療分子を送達するためのベクター被覆に必要な scFv-213 の改変を行い、ほ乳類細胞の形質膜に発現する誘導体を作成した。また、今後の抗体機能の改善を細胞レベルで検証するための基盤技術の構築に一定の成果を得た。

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
2. 学会発表
(国際学会)
(国内学会)

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含