

- 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
12. 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、
13. 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
14. Makoto Yamagishi, Harutaka Katano, Kazumi Nakano, Yasunori Ohta, Tsunekazu Hishima, Seiji Okada, and Toshiaki 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
15. Yuki Hiromichi, Shikiko Ueno, Hiro Tatetsu, Hiroaki Niuro, Hiroyuki Hata, Seiji Okada, Toshiaki 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 鎌田伸好、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
20. 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
1. 服部真一郎、淵上典子、刈谷龍昇、鈴木伸也、岡田 誠治. HIV-1 感染における CD4+Foxp3+T 細胞の動態および感染性の検討. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会、京都市国際交流会館、京都、2011 年 6 月 25-26 日.
2. 松田幸樹、服部真一郎、刈谷龍昇、嶋本雅子、濱田浩一、岡田誠治. Cepharanthine は HIV の侵入を阻害することで、感染を抑制

- する。第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会、京都市国際交流会館、京都、2011 年 6 月 25-26 日。
3. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Eriko Kudo, Koki Matsuda, Shinichiro Hattori, Manabu Taura, Koichi Hamada, Harutaka Katano, and Seiji Okada. The antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF-kappaB. 第 73 回日本血液学会、名古屋国際会議場、名古屋、2011 年 10 月 14-16 日。
 4. Shotaro Hagiwara and Seiji Okada. Non-AIDS-defining hematological malignancies in HIV-infected patients: an epidemiological study. 第 73 回日本血液学会、名古屋国際会議場、名古屋、2011 年 10 月 14-16 日。
 5. 岡田誠治. HIV 感染症と血液悪性腫瘍. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 6. 服部真一郎、刈谷龍昇、Pattaravadee Srikoon、松田幸樹、岡田誠治. NOD/SCID/Jak3^{-/-}マウスを用いたヒト NK 細胞モデルマウスの構築及び HIV-1 感染. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 7. 青木宏美、鋏田伸好、服部真一郎、林宏典、青木学、岡田誠治、満屋裕明. mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスと抗 HIV-1 剤によるその変容の検討-1. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 8. 鋏田伸好、青木宏美、服部真一郎、林宏典、青木学、中村太平、岡田誠治、満屋裕明. mCherry 可視化 HIV-1 を用いた HIV-1 体内播種早期ダイナミクスと抗 HIV-1 剤によるその変容の検討-2. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 9. 四本美保子、味澤篤、萩原將太郎、田沼順子、上平朝子、永井宏和、藤川裕子、北野喜良、有馬靖佳、宇野健司、岩井俊樹、本郷偉元、岡田誠治. 本邦におけるエイズ関連ホジキンリンパ腫 19 例の実態. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 10. 工藤恵理子、谷本周穂、田浦学、高橋大介、戸嶋一敦、岡田誠治. フラーレン誘導体による HIV-1 増殖抑制効果. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 21. 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子. R5 及び X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、ハイアットリージェンシー東京、東京、2011 年 11 月 30 日-12 月 2 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

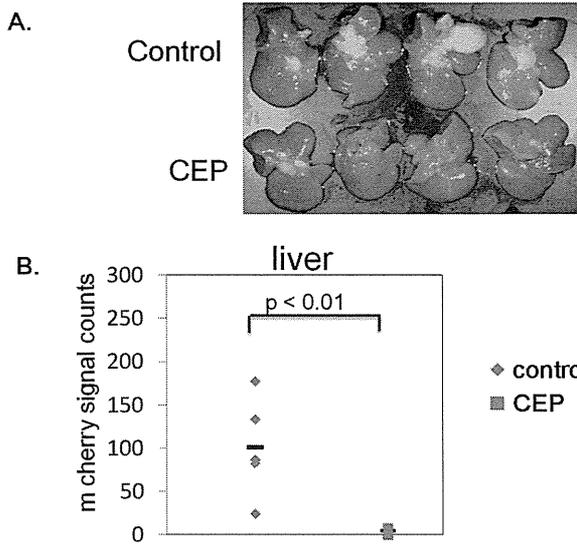


図1. 蛍光標識した ATL 細胞の定量的検出とセファランチン(CEP)の抗 ATL 効果の検討

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。

図2. ATL 細胞株 Nude R/J マウス皮下への生着

3 種類の ATL 細胞株(ST1, TLOM1, Eb-)を Nude R/J1 マウス皮下に移植したところ、いずれ細胞株も腫瘍を形成した。

ST1 : 1×10^7 cells
皮下移植後 3 週間



TLOM1 : 5×10^6 cells
皮下移植後 4 週間



Eb- : 5×10^6 cells
皮下移植後 4 週間

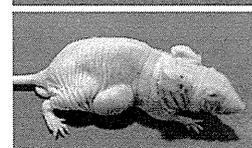
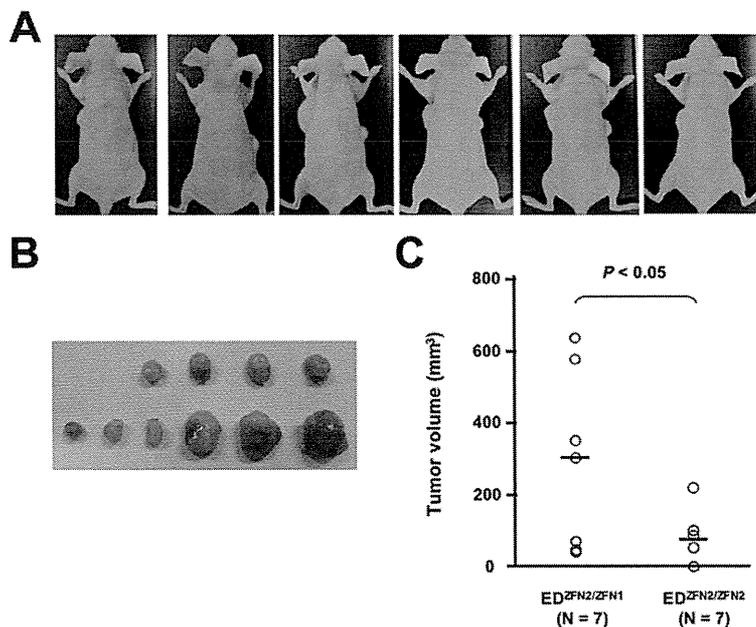


図3. マウスモデルを用いた ATL 細胞の治療効果判定系の樹立と ZEN の有効性評価



分担研究課題：抗体工学を応用した HTLV-1 感染標的に対する安全な治療分子送達法の開発 (I)

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。本事業研究では 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。これを受けて、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、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。

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導入では、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した。

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した。

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、目視により結合構造を10個程度までに絞る。絞られた10個程度の結合構造に対して、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 抗原ならびに抗体の発現精製

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。

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、超音波破碎機で菌膜を破碎した。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を得た。

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碎する。溶出した細胞液を遠心機に掛けた後に、上精を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を得た。

B-3 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。

(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 (図 4)。

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 5)。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 5)。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 6)。

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 7)。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 8)。

C-2 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 9 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、orion 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-3 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 10(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 10(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 10(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。

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。

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。

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。また抗体 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

W. Li, J. Shen, Y. Tang, T. Hoshino :
Exploring coumarin egress channels in human cytochrome P450 2A6 by random acceleration and steered molecular dynamics simulations,
Proteins, 79, 271-281 (2011)

MD Iqbal Mahmood, Y. Matsuo, S. Neya, T. Hoshino :
Computational Analysis on the Binding of Epitope Peptide to Human Leukocyte Antigen Class I Molecule A*2402 Subtype,
Chem. Pharm. Bull. 59, 1254-1262 (2011)

H. Yuki, T. Honma, M. Hata, T. Hoshino :
Prediction of sites of metabolism in a substrate molecule, instanced by carbamazepine oxidation by CYP3A4,
Bioorg. Med. Chem. 20, 775-783 (2012)

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)

Md. Iqbal Mahmood, Xinli Liu, S. 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)

- ムハマド イクバル, 松尾 佑里, 根矢 三郎,
星野 忠次 :
ヒト白血球抗原によるエピトープの認識に
関する計算化学的解析.
第 21 回金属の関与する生体関連反応シンポ
ジウム、千葉(2011. 5. 30)
- 星野 忠次 :
タンパク質と脂質膜の吸着過程の計算機解
析.
CRESTシンポジウム「トップダウンとボ
トムアップの融合によるナノ構造の作製と
新機能発現」、東京(2011. 10. 18)
- 幸瞳、本間光貴、畑晶之、星野忠次 :
分子動力学計算を用いた化合物の代謝部位
予測 : CYP3A4 と carbamazepine への適用.
第 39 回構造活性相関シンポジウム、野田
(2011. 11. 28)
- MD Iqbal Mahmood, Saburo Neya, Tyuji
Hoshino :
Influence of lipid composition on the
structural stability of G-protein coupled
receptor, スーパーコンピューターワークシ
ョップ 2012、岡崎(2012. 1. 25)
- 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)

- 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 マハット：
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

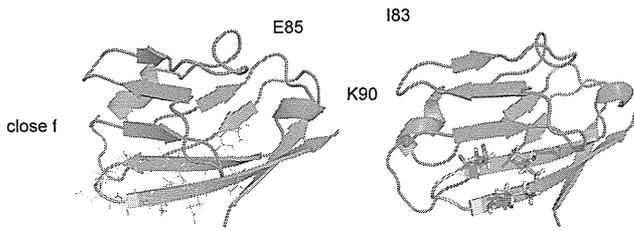


図1：抗原 CD4D1 のモデル構造。Glu85 や Lys90 の周辺が認識部位と予想される。PDB に登録された X 線結晶構造 (2B4C) より作出した。

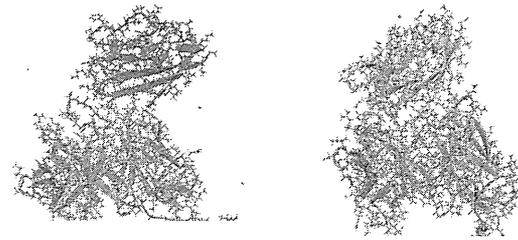


図3：抗体 H0538-213 の scFv と抗原 CD4D1 の結合モデル構造。ループが捻れた形 (左: close form) と伸びた形 (右: open form)。

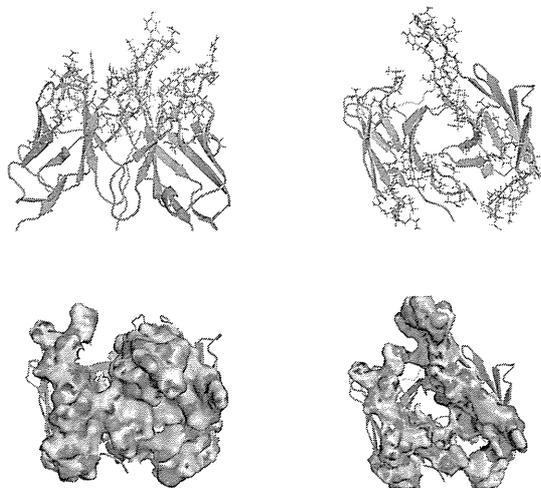


図2：抗体 H0538-213 の scFv のモデル構造。PDB に登録された X 線結晶構造 (3EYF) より作出した。CDR の H3 ループが長いため、これが捻れた形 (左: close form) と伸びた形 (右: open form) の2つを用意した。

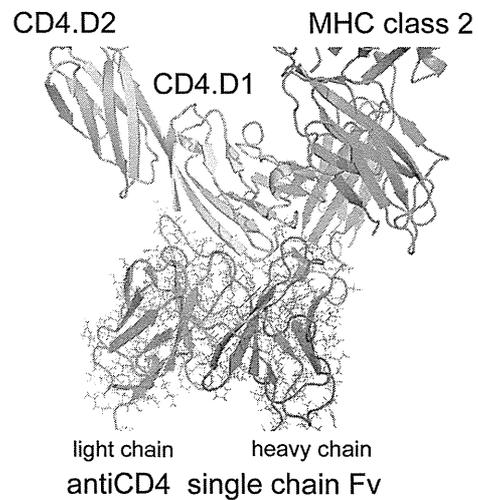
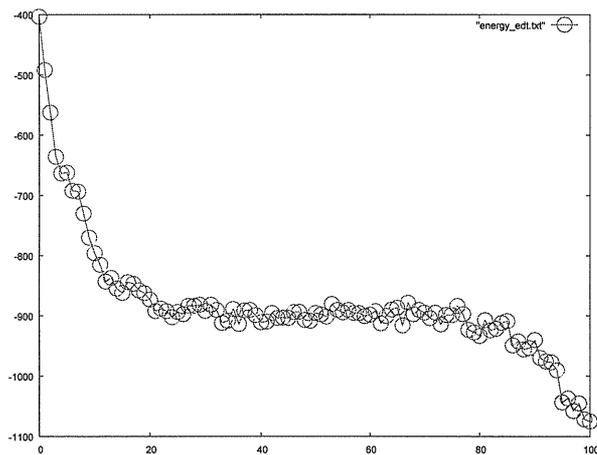
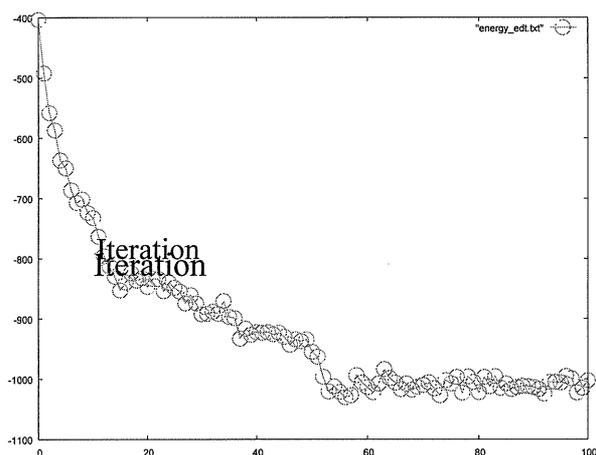


図4：抗原 CD4D1 と抗体 H0538-213 scFv の結合予測構造。抗原 CD4D1 のループ部分が抗体により捕捉されている。CD4 と MHC との相互作用の位置も比較のため示した。抗体 H0538-213 と相互作用する位置が異なる。



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	VVSYDGR-TTYADSVK
	1_37	VFKWDGRWYYYAYDSVK
	1_56	VFKWRNRWYYYAYDSVK
H3	213_0	KDLNKGVCNNGGCGVD
	1_37	KKWNKAFKNNGGYYGVD
	1_56	KKWRKAFKNNGGYYGVD

CDR	variants	amino residues
L1	213_0	RASQSVNNYL
	2_66	RASQSVNNWD
	2_99	RASQSVNNWL
L2	213_0	DASNRAT
	2_66	LASNRAT
	2_99	LASNRAT
L3	213_0	QQRGN-WPHT
	2_66	QYRGRSWPHT
	2_99	QWRKRSWPHT
H1	213_0	SYGMH
	2_66	SYGMH
	2_99	YYAMH
H2	213_0	VVSYDGRTTYADSVK
	2_66	FVLYDGRTTYND SVK
	2_99	FVLYDGRTTYNR SVK
H3	213_0	KDLNK-GVCNNGGCGVD
	2_66	KRLNKKYYN-IGVCY GVD
	2_99	KIWNKKRYNFFGVCY GID

図5：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6：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。

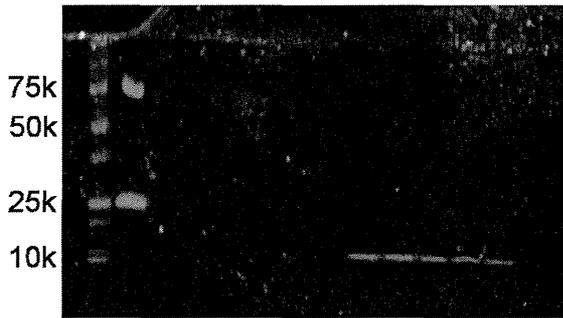
L1	213_0	RASQSV-NNYL
	1_37	RASYSD-WNYL
	1_56	RASYSDSWNYW
	2_66	RASQSV-NNWD
	2_99	RASQSV-NNWL
L2	213_0	DASNRAT
	1_37	DWNYRAT
	1_56	DWNYAT
	2_66	LASNRAT
	2_99	LASNRAT
L3	213_0	QQRGN-WPHT
	1_37	QYRGN-WKHT
	1_56	QYRGN-WKHT
	2_66	QYRGRSWPHT
	2_99	QWRKRSWPHT
H1	213_0	SYGMH
	1_37	SYEMH
	1_56	DYEMH
	2_66	SYGMH
	2_99	YYAMH
H2	213_0	VVSVDGR-TTYYADSVK
	1_37	VFKWDGRWYYYAYDSVK
	1_56	VFKWRNRWYYYAYDSVK
	2_66	FVLYDGRTTYYNDSVK
	2_99	FVLYDGRTTYYNRSVK
H3	213_0	KDLNKGVCN-NGGCVGVD
	1_37	KKWNKAFKN-NGGYGV
	1_56	D
	2_66	KKWRKAFKN-NGGYGV
	2_99	D
		KRLNKKYYN-IGVCYGVD KIWNKKRYNFFGVCGID

図7：2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。

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

図8：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。

(a) CD4D1



(b) HO538-213 scFv

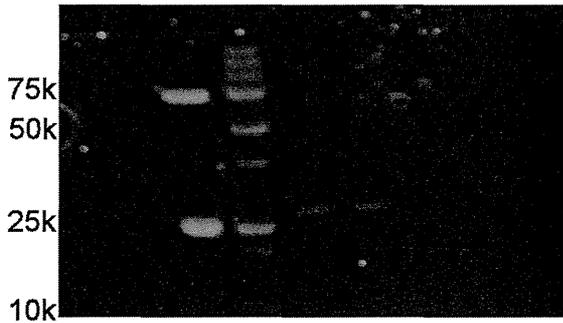


図 9 : 抗原 CD4D1 と抗体 HO538-213 の scFv の大腸菌による発現精製後のゲル泳動図。

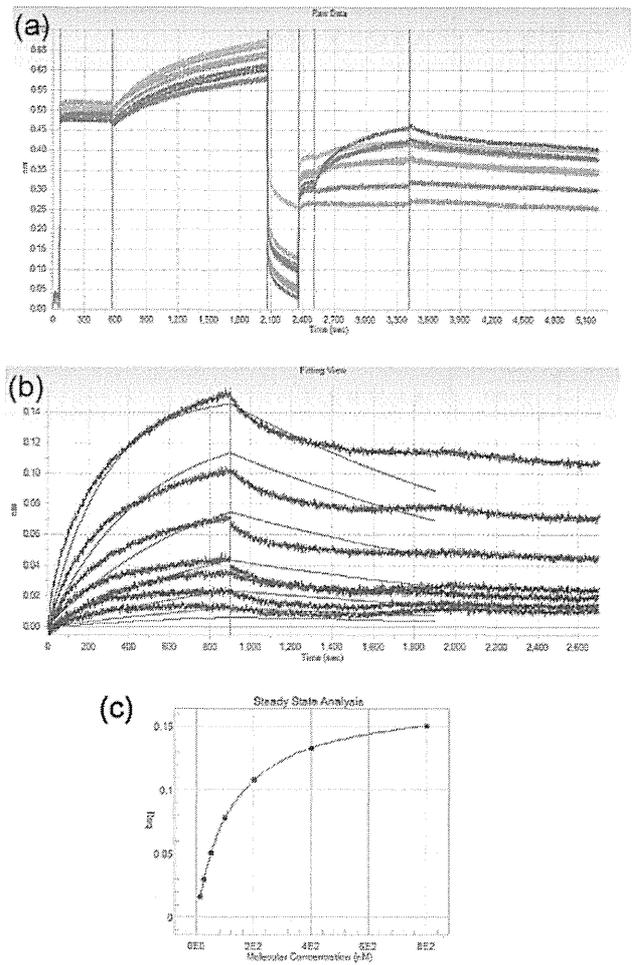


図 10 : 抗原 CD4D1 と抗体 HO538-213 scFv の結合親和性評価。(a) 抗原 CD4D1 を固体化したセンサーチップと抗体 HO538-213 scFv との相互作用によるシグナル変化。(b) 各濃度における(a)のシグナルの比較。(c) 定常状態解析による結合解離定数の算出。

分担研究課題：抗体工学を応用した HTLV-1 感染標的に対する安全な治療分子送達法の開発（II）

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。本研究で利用する LENA ベクターの被覆を可能にする変異体への改変を行い、それらの機能維持を確証づけるのを目的とする。このため、HO538-213 遺伝子の L 鎖と H 鎖の可変領域を鋳型に単鎖化し、さらにはほ乳類細胞の形質膜に表出するように抗体工学的に改変した。その結果、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ほ乳類細胞の細胞表面に発現させることに世界で初めて成功した。膜表出変異体は抗原である CD4 との親和性を維持していた。我々が構築した抗原と抗体の精製系を利用すれば、抗体の機能向上を検証する事が容易となる。我々の構築したシステムは実査の治療に有用であることが示唆され、今後の実用化研究への進展が期待できる。

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。第一段階の改変は H 鎖と L 鎖をリンカーを用いて結合する。scFv 化にはしばしば抗原に対する親和性の減弱が伴う事が知られているため、ヒト CD4 に対する反応性を維持しているについて検討を行い、遺伝子分析の結果から遺伝子配列の適正化を行う。適正化の効果を確認し scFv-213 の分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、副作用の観点から、CD4 の生理機能を担う部位と異なる部位をエピトープとして認識するかを検証する。第 2 段階として、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

1. 第一段階 I HO538-213 の scFv 化

抗体の遺伝的改変：健常人由来CD4反応性 IgM抗体クローンに由来するHO538-213遺伝子のL鎖とH鎖の可変領域を鋳型として2ステップのPCRを行った。第一段階のPCRでH鎖とL鎖の可変領域をPCRで増幅する。第一段階のPCRプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを利用する。

H鎖5'プライマー：GGT GGT TCC TCT AGA
TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC
TCG GGC GGT GGT GGG CAG GTG CAG
CTG GTG CAG TCT GG

H鎖3'プライマー：CCT GCG GCC GCA GAA
GCG TAG TCC GGA ACG TCG TAC GGG
TAA AGG GTT GGG GCG GAT GCA CTC
CC

L鎖5'プライマー：CCT GCT AGC GAA ATT
GTG ATG ACG CAG TCT CC

L鎖3'プライマー：GGA AGA TCT AGA GGA
ACC ACC TCG TTT GAT CTC CAG CTT
GGT CCC

リンカーとして以下のアミノ酸配列を用いる。
Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Gly
-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly

得られたPCR産物をアガロース電気泳動して分離精製後両者を同濃度で混ぜたものを鋳型として第二段階のPCRを行う。第二段階のPCRプライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを利用する。

5'プライマー：GAG GAG GAG GAG GAG
GAG GCG GCT AGC GAA ATT GTG

3'プライマー：GAG GAG GAG GAG GAG
GAG CCT GCG GCC GCA GAA GC

得られたPCR産物をアガロース電気泳動して分離精製後NheIとNotIで切断する。スピンカラムで精製後、pFab1ベクターのNheI-NotI領域にクローニングする。クローニング後、いくつかの独立したクローンについてシーケンシングを行い増幅した核酸断片が目的の配列であるかどうかの確認を行う。正しい配列のクローンを用いて大腸菌でscFvの生産を行う。タンパク質の精製はHisタグを用いて行う。

抗原抗体反応の検証：ELISAでの反応性の確認は以下の手順で行う。ヒト可溶性CD4 (sCD4, 2mg/mL) をELISAプレートに加えて4℃1晩置くことにより固相化する。スキムミルクで37℃一時間ブロック後、緩衝液で洗浄し、scFvの濃度を変えて37℃で反応させる。緩衝液で洗浄後、2次抗体としてHRP結合抗HA抗体を37℃一時間反応させる。TMBを発色試薬として用い吸光度を測定する。

抗原の調製：抗原反応性とエピトープ解析のため細胞外CD4のドメイン1のみとドメイン1+2を発現するベクターpComb3XmD1.1とpSecTagBD1D2を用いて産生を行う(Chen W et al., J Virol 2011)。精製抗原の質を評価するために、上記の方法と

同様に精製標品を40uMの濃度でELISAプレートに固相化してCD4反応性のマウスモノクローナル抗体 (mAb) Leu-3a (1:100希釈) を検出プローブとしてELISAを行った。

2. 第一段階 II scFv 遺伝子の適正化

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。そのために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。

3. 第二段階 膜移行型 scFv への改変

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

1. 第一段階 I HO538-213 の scFv 化

HO538-213 遺伝子の遺伝的改変にて得られた複数の独立した scFv 候補クローンについてシーケンシングを行ったところ高効率で計画通りの配列が得られていることが確かめられた。全体の構造は NheI (制限酵素) -L 鎖可変領域-リンカー-H 鎖可変領域-HA タグ-NotI (制限酵素) -His タグ (ベクター側) であることを確認した。

次に大腸菌で scFv 化 HO538-213 を生産し ELISA でヒト sCD4 に対する反応性を検証した。塩基配列が同じ 3 個の独立したクローンについて大腸菌培養液から B-PER を用いて得た抽出液について ELISA を行った。陽性コントロールとしてヒト陽性血清を用いた。

	OD650
コロニー 1	0.465
コロニー 2	0.387
コロニー 3	0.373
陽性コントロール	0.327

3 クローンとも同様の OD 値が得られ、ELISA で陽性と判断した。従って scFv 化 HO538-213 はヒト CD4 に対する反応性を維持していることが示された。