

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780228
 研究課題名 (和文) 多包性エキノコックス症の予防や治療に有効な抗体医薬の研究開発
 研究課題名 (英文) Development of the antibody drug for prevention and treatment against alveolar echinococcosis
 研究代表者
 後藤 明子 (GOTO AKIKO)
 北海道立衛生研究所・感染症センター生物科学部・研究職員
 研究者番号：60414322

研究成果の概要 (和文)：ヒトの多包性エキノコックス症は多包条虫の幼虫寄生を原因とする人獣共通寄生虫感染症であり、病巣を外科的に摘出する以外に確実な治療法はない。多包性エキノコックス症の診断法や治療法を改良開発するためのツールとして、遺伝子工学的手法を用いて多包条虫由来の抗原に特異的に反応する組換えモノクローナル抗体の作製を行った。その結果、多包条虫由来の抗原に反応する組換えモノクローナル抗体を4種類作製することができた。

研究成果の概要 (英文)：Alveolar echinococcosis, which is caused by the larva of *E. multilocularis* (Em), is a life-threatening zoonotic parasitosis in humans. To develop the diagnosis and antibody drug for treatment against alveolar echinococcosis, I tried to construct some recombinant monoclonal antibodies from Em-infected mouse by using molecular biological methods. In result, four recombinant monoclonal antibodies reacting with Em antigen were constructed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	480,000	3,180,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：①人獣共通感染症 ②多包性エキノコックス症 ③抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

ヒトの多包性エキノコックス症は包条虫属の *Echinococcus multilocularis* (多包条虫、Em) の幼虫 (多包虫) 寄生を原因とする人獣共通寄生虫感染症である。Em は日本では北海道にみられ、げっ歯類を中間宿主、キツネやイヌを終宿主として感染環を形成している。

ヒトの多包性エキノコックス症は経口的に摂取された Em の虫卵が消化管で孵化し、血流を経て肝臓などの各臓器に定着した多包虫が悪性腫瘍状の病巣を形成することで発症する。ヒトでは多包虫の発育が遅く、初期の自覚症状はないため、症状が現れた時は末期の事が多い。現在は病巣の拡大が進行しないうちに血清診断や画像診断で病巣を発

見し、外科的に切除摘出する以外に確実な治療法はない。しかし、体力的に負担が大きいと判断された場合などは、手術療法が適用されない場合もある。そのため、侵襲が少なく体に負担が少ない治療法を新しく開発することが必要である。

近年、抗体分子そのものを感染症やがんの予防や治療に役立てる研究が進められており、一部は既に「抗体医薬」としてがん治療などに実用化されている。抗体医薬の技術はがんやリウマチ、ウイルス感染症の治療において実用化が進んでいるが、寄生虫感染症への適用についてはほとんど研究が進んでいないのが実情である。そのため、抗体医薬開発の技術を応用することで多包性エキノコックス症の治療法や予防法を新たな観点から開発できる可能性が大きい。また、多包性エキノコックス症の基礎的研究や検査法の改良においても、多包虫由来の各種抗原に反応するモノクローナル抗体は重要なツールとなりうるということが考えられる。

従来はハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の作成によって、抗体医薬として使用可能な抗体分子の探索が行われていた。しかしこの方法だと抗体を得るのに時間がかかるなどの問題があった。近年、抗体の可変領域遺伝子の cDNA をクローニングし、抗体遺伝子のライブラリーとした後、目的の抗原に反応する抗体を選択・回収する技術が開発されたため、抗体医薬として有用な抗体の分離が容易になった。

2. 研究の目的

多包性エキノコックス症の診断法や治療法を新たな視点で改良開発するため、Em に感染したマウスより得られた抗体遺伝子の cDNA ライブラリーを作製し、遺伝子工学的手法を用いて多包虫由来の抗原に特異的に反応する組換えモノクローナル抗体の作製と性状解析を行う。その中から多包性エキノコックス症の治療に有効な「抗体医薬」の候補や診断法の改良に有用な抗体を探索する。

3. 研究の方法

C57BL/10 系マウスに多包条虫卵を 1,000 個経口投与し、多包虫に感染させた。虫卵投与より 16 週間後にマウスの脾臓を摘出し、B リンパ球細胞を含む細胞成分を分離して、mRNA を抽出精製した。次に RT-PCR 法で IgG 抗体の重鎖と軽鎖の可変領域遺伝子をそれぞれ増幅し、リンカーで接続して一本鎖抗体遺伝子を作成した。さらに、この一本鎖抗体遺伝子を蛋白質発現用プラスミド pASK に組み込んで、組換えモノクローナル抗体の cDNA ライブラリーを作製した。

PCR によるインサートチェックとウエスタンブロット法による発現スクリーニングによって、重鎖と軽鎖の両遺伝子を正常に発現するクローンを cDNA ライブラリーより選別した。選別された抗体クローンそれぞれの塩基配列を解析し、全く同じ塩基配列のクローンが重複していないことを確認した。

大腸菌を用いてそれぞれの組換え一本鎖モノクローナル抗体タンパク質を発現して精製し、ウエスタンブロット法で多包虫由来の粗抗原や組換え抗原などとの反応性を確認した。

4. 研究成果

今回構築した cDNA ライブラリーより得られた 361 クローンをコロニーPCR でスクリーニングしたところ、一本鎖抗体遺伝子の全長が挿入されていたクローンが 27 クローン、重鎖または軽鎖の配列のみが挿入されていたのが 51 クローンあることが確認された。一本鎖抗体遺伝子の全長が挿入されていた 27 クローンについて、大腸菌を用いて実際に組換え一本鎖モノクローナル抗体タンパク質を発現させ、ウエスタンブロット法で確認してみたところ、フレームシフトの発生などによって途中で停止コドンが存在したために全長の発現がみられなかったものが 17 クローン存在した。さらに、残り 10 クローンの塩基配列を解析したところ、全く同じ配列だったものが 1 組 (2 クローン) 存在した。

組換え一本鎖モノクローナル抗体タンパク質の全長を発現することができた 9 クローン (Fig.1) について、粗抗原短冊との反応性を確認したところ、粗抗原中の約 18 kDa 付近の成分を抗原として認識する組換え一本鎖モノクローナル抗体が 4 クローン見いだされた (Fig.2A)。また、これらの組換え一本鎖モノクローナル抗体は、Em の組換え抗原である EmII/3 の C 末端部分 (EmII/3#7) にも同様に反応を示したため (Fig.2B)、現在多包性エキノコックス症の診断に使われている抗原に反応を示す可能性が示唆された。

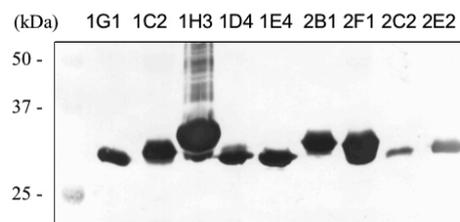


Fig. 1. 組換え一本鎖抗体の発現の確認

ウエスタンブロット法で組換え一本鎖抗体クローン (1G1, 1C2, 1H3, 1D4, 1E4, 2B1, 2F1, 2C2, 2E2) の発現を確認した。各組換え一本鎖抗体は C 末端側に Strep-tag を付加した融合蛋白質として発現しており、検出にはアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを用いた。

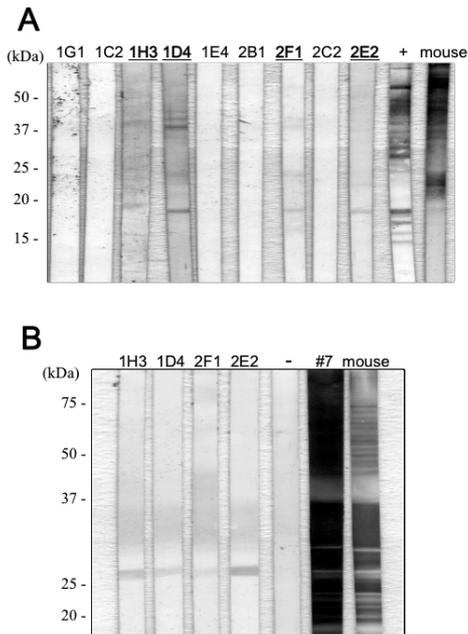


Fig. 2. 組換え一本鎖抗体と各種Em抗原との反応性粗抗原 (A) または組換え蛋白質抗原Eml/3-#7(B) を転写した短冊を用いて、組換え一本鎖抗体とEm抗原の反応性を確認した。使用抗体：組換え一本鎖抗体 (1G1, 1C2, 1H3, 1D4, 1E4, 2B1, 2F1, 2C2, 2E2)、エキノコックス症患者血清 (+)、エキノコックス感染C57BL/10マウス血清 (mouse)、陰性対照 (-)、抗Eml/3#7抗原マウス血清 (#7)

今回、遺伝子工学的手法を用いて、Em 感染マウス体内で産生されている IgG 抗体のうち、Em 由来の抗原に反応する可能性が高い組換え一本鎖モノクローナル抗体を4種類作製することができた。これら組換え一本鎖モノクローナル抗体は、今回得られた抗体遺伝子 cDNA クローン の元となった Em 感染マウスの血清が認識する抗原と同じものを認識していたため (Fig.2B)、マウスの血清に含まれている抗体と同じものを作製できた可能性も考えられた。しかし、cDNA ライブラリーを作成する際に PCR で抗体遺伝子を相当増幅しているため、今回得られた組換え一本鎖モノクローナル抗体の種類と性状が感染マウス生体内で産生されている抗体の種類と量の傾向を直接反映している可能性は低いと考えられる。

今回の研究では、Em 由来の抗原に反応する組換えモノクローナル抗体を複数作製することができたものの、当初の目的であった「多包性エキノコックス症に対する『抗体医薬』の開発」には至らなかった。今後はこれまで得られた一本鎖抗体遺伝子の組換えなどを行って、様々な種類の Em 由来抗原に反応する組換えモノクローナル抗体を作製し、新たな診断法や治療法の開発の際に重要なツールとして使用できるようなシステムを構築していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Yoshinobu Katoh, Hirokazu Kouguchi, Jun Matsumoto, Akiko Goto, Tomohiro Suzuki, Yuzaburo Oku, Kinpei Yagi. Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 1-6, 2008, 査読あり.

②Kimiaki Yamano, Akiko Goto, Masahiro Miyoshi, Koji Furuya, Yukiharu Sawada, Naoki Sato.

Diagnosis of alveolar echinococcosis using immunoblotting with plural low molecular weight antigens.

Journal of Helminthology, 83, 57-61, 2009, 査読あり.

③Kimiaki Yamano, Akiko Goto, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Yukifumi Nawa, Noriyasu Hada, Tadahiro Takeda.

Gal B 1-6Gal antigenic epitope which accounts for serological cross-reaction in diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection.

Parasite Immunology, 31, 481-7, 2009, 査読あり.

④Kimiaki Yamano, Akio Kanetoshi, Akiko Goto, Miori Kishimoto, Nobuyuki Kobayashi, Satoshi Fujimoto, Kazutaka Yamada.

Japanese monkey (*Macaca fuscata*) with alveolar echinococcosis after treatment with albendazole for 10 years: serodiagnosis and determination of albendazole metabolites.

Parasitology Research, 106, 69-74, 2009, 査読あり.

⑤Mario L. de la Rue, Kimiaki Yamano, Cybele E. Almeida, Margarete P. Iesbich, Cloe D. Fernandes, Akiko Goto, Hirokazu Kouguchi, Kenichi Takahashi.

Serological reactivity of patients with *Echinococcus* infections (*E. granulosus*, *E. vogeli*, and *E. multilocularis*) against three antigen B subunits.

Parasitology Research, 106, 741-745, 2010, 査読あり.

〔学会発表〕（計 2 件）

①後藤明子、八木欣平、山野公明
遺伝子工学的手法を用いた多包虫に対する
組換えモノクローナル抗体の作製
第 78 回日本寄生虫学会大会
2009 年 3 月 28 日 法政大学市ヶ谷キャンパス
（東京都千代田区）

②後藤明子、八木欣平、山野公明
遺伝子工学的手法を用いた多包虫に対する
組換えモノクローナル抗体の作製と性状解
析
第 148 回日本獣医学会学術集会
2009 年 9 月 25 日 とりぎん文化会館（鳥取
県鳥取市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 明子 (GOTO AKIKO)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・研究職員
研究者番号：60414322

(2)研究協力者

山野 公明 (YAMANO KIMIAKI)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・感染病理科長
研究者番号：40435566

八木 欣平 (YAGI KINPEI)
北海道立衛生研究所・感染症センター
生物科学部・主任研究員
研究者番号：70414323