

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790958

研究課題名（和文） 肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体が認識するエピトープと中和能の検討

研究課題名（英文） Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine

研究代表者

田尻 和人 (TAJIRI KAZUTO)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：30512165

研究成果の概要（和文）：

細胞マイクロアレイシステムで得られた抗HBVモノクローナル抗体を用いて検討した。エピトープ解析では、HBV表面蛋白の細胞外ループ部が強い抗原性を持ち、HBV中和能に関連することを示した。抗体の組み合わせにより様々なgenotype、エスケープミュータントとして知られるG145Rに対してもHBV中和効果を示した。

これらの知見は、今後ユニバーサルワクチネーションが検討されており、現行のワクチンで様々な genotype、ミュータントを含めた HBV 中和が可能であることを示す。また、モノクローナル抗体もしくはその組み合わせによる抗体療法の可能性も示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed using monoclonal antibodies for neutralizing HBV, which were obtained by cell-microarray system. Epitope analysis showed that extracellular loop lesion of HBs-Ag has the antigenicity and concerns HBV-neutralization. Combination of the antibodies showed the neutralizing capacity against various genotype of HBV including G145R which is known for the escape mutant. These findings imply that HBV-vaccination is useful for the prevention of HBV-infection with various genotype or mutant HBV. Furthermore, the possibilities of antibody treatment using monoclonal antibodies or their combination for HBV-infection may be suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器内科、免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：(1) B型肝炎ウイルス (2) 中和抗体 (3) Small-HBsAg (4) 抗体療法 (5) 細胞マイクロアレイシステム

1. 研究開始当初の背景
B型肝炎ウイルス(HBV)感染保有者は、我が国では約130～150万人（世界では約4億人

のHBV保有者)がおり、その約1割において病変が進行して肝硬変・肝細胞癌に至る（慢性肝炎の治療ガイド 2008、日本肝臓学

会編)。HBV はウイルス粒子の最外層にエンベロープ蛋白 (HBsAg) を有し、感染に際しては、HBsAg が宿主の肝細胞への接着・侵入に重要な役割を果たしている (Glebe D. Gastroenterol. 2005, Glebe D. World J Gastroenterol. 2007)。現在、その感染予防に際しては HB ワクチンと高力価 HB 免疫グロブリン (HBIG) が用いられており一定の効果が得られている。HB ワクチンは HBV-DNA を有さないエンベロープ蛋白である HBsAg のみからなり、また HBIG は HBsAg に対する抗体 (HBsAb) を高力価で含むものであり、上述したように、HBsAg の HBV 感染における役割の重要性を裏付けるものであるといえる。しかし、HB ワクチンには、HB ワクチン不応例・変異ウイルスによるワクチン escape、HBIG には血液製剤ゆえの感染性・経済性などの問題が残っている。さらに我が国では HBIG のほとんどを海外 (主に米国) に依存しており、国内自給率は 5% 以下と低く、供給の安定性という点からも問題であるといえる。

一方、近年になり生体肝移植が行われるようになり、HBV 肝硬変・HBV 肝細胞癌もその対象であるが、肝移植後の移植肝への HBV 再感染が問題となっている。移植肝での HBV 再感染例では、肝炎は急速に進行し、早期に肝不全となることも多いことから HBV の感染予防が重要とされる。その予防には、抗ウイルス剤内服による HBV 増殖抑制に加え、HBIG・HB ワクチン投与が行われている。しかし、免疫抑制剤の内服下であり、HB ワクチン不応となることが多く、また HBIG を移植後、半永久的に投与する必要がある (Shouval D, et al. Hepatology 2005)。こうした状況からも、効率のよい HB ワクチンの開発に加え、HBIG に変わる抗体製剤の開発の必要性が挙げられる。我々の教室では、これまでに細胞マイクロレイシステムを開発し、抗原特異的 B 細胞の検出と抗原特異的抗体の取得におけるその有用性を報告してきた (Yamamura S. Anal Chem 2005)。同システムを用いて HB ワクチンを投与された健康人ボランティアより HBsAg に対するヒト型のモノクローナル抗体をこれまでに約 40 種取得することに成功している。これらのヒト由来の抗 HBV モノクローナル抗体は HBsAg を認識し、一部の抗体はモノクローナル抗体単独で HBV の中和活性が認められている。このような HBV 中和効果をもつ抗体をリコンビナント蛋白として大量に調整すれば、HBIG に代わる抗体製剤としての応用が期待される。実際に、抗 HBV モノクロー

ナル抗体を用いた HBV 感染予防への応用も試みられたこともあるが、HBIG を上回る臨床的な効果はこれまでは確認されていない (Galun E, et al. Hepatology 2002, van Nunen AB, et al. Liver 2001)。本研究では細胞マイクロレイシステムを用いて得られた約 40 種のヒト型抗 HBV モノクローナル抗体の HBV に対する生理的活性を評価し、抗体製剤への応用を図ることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では B 型肝炎ウイルス (HBV) に対するモノクローナル抗体の認識する抗原エピトープとそれぞれの B 型肝炎ウイルス中和効果を解析し、モノクローナル抗体あるいはその組み合わせを用いた効率的な B 型肝炎ウイルス中和作用・感染阻止作用につき検討する。これらの研究結果を用いて B 型肝炎ウイルスの感染予防に際し、現在用いられているヒト血液製剤 (高力価 HB グロブリン製剤) からリコンビナント抗体を用いた抗体治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

① それぞれの抗 HBV モノクローナル抗体の生理的活性の評価

それぞれの抗体遺伝子を無血清培地で培養可能な CHO 細胞に遺伝子導入し、その上清中に抗体蛋白を得る。得られた抗体蛋白をプロテイン G カラムを用いて精製した後、リン酸バッファーを用いて透析し、高濃度の抗体溶液を得る。抗体溶液を用いて、HBsAg を固相化したプレートを用いた ELISA により結合性の評価と、HBsAg による阻害実験 ELISA により HBsAg 特異性を評価する。さらに、HBsAg を固定化したセンサーチップを用いて、BIACORE にて表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により抗体の HBsAg への親和性を評価する。

② 抗 HBV モノクローナル抗体が認識する抗原エピトープの解析

HBsAg は、HBV ウイルス粒子の最外層にあるエンベロープ蛋白で、226 個のアミノ酸からなる。その細胞外領域の部分が B 細胞の抗原決定基 (epitope a) とされている。epitope a の約 60 アミノ酸からなる領域を 10 前後のアミノ酸領域に断片化した形のペプチドを作成する。epitope a はジスルフィド結合により立体構造を形成しているとされるので、立体構造を保持した形でもペプチドを合成し、それぞれの抗 HBV モノクローナル抗体が epitope a のどのアミノ酸領域を認識するのかを決定する。

③ それぞれの抗体の HBV 感染阻止作用の検討

それぞれの抗 HBV モノクローナル抗体を、

HBV 感染患者血清由来の HBV を用いて、HBV 中和能を検討する。HBV を高濃度に含む HBV 感染患者血清と、それぞれのモノクローナル抗体またはコントロール IgG を pre-incubation し、その後、HBV と抗体の混合溶液を、HBV 感染能が確認されている HepaRG 細胞株 (Glebe D, et al World J Gastroenterol. 2007) に添加する。その後、経時的に上清中の HBsAg 蛋白の定量・HBV-DNA の定量・HepaRG 細胞の免疫染色などを行い、HBV の感染と、それぞれの抗体による阻害の程度を評価する。さらに、その結果を上記 1、2 の実験結果と合わせて検討することで、epitope a のどの領域を認識する抗体が、HBV 感染阻害効果をどの程度示すのかを解析し、HBsAg が HBV 感染において果たす役割についても検討する。

④ HBsAg ミュータントに対する抗 HBV モノクローナル抗体の結合における影響の検討

HBV では HBsAg においていくつかのアミノ酸変異が起こることが報告されており、最も研究が進んでいるのが、epitope a 内の 145 番目のアミノ酸置換 (グリシンからアルギニン) である。このことは、HB ワクチン escape の原因とされており (Carman WF, et al. Lancet 1990)、また HBIG からの HBV escape の原因とも考えられている (Cooreman MP, et al. J Biomed Sci 2001)。epitope a の 2 番目のループ構造 (アミノ酸 138-147 番) を保持したペプチドに加えて、ループ構造を保持したまま 145 番目のアミノ酸置換 (グリシンからアルギニン) を入れたペプチド、さらに変異の報告のある 141 番目のアミノ酸置換 (リジンからグルタミン酸) を入れたペプチドを合成し、それぞれのペプチドへの抗 HBV モノクローナル抗体の結合性を、ELISA、SPR 法を用いて解析する。これらの解析結果により、変異 HBV に応答するモノクローナル抗体につき検討するとともに、変異 HBV のアミノ酸置換による抗体の親和性の変化を検討することで、HBV escape の機序についても検討する。

⑤ 異なるエピトープを認識する抗体を組み合わせることで HBV 感染阻止作用の検討

epitope a の異なる領域を認識し、単独でも HBV 感染阻止作用を持ち、またさらには、変異 HBV に応答する作用をもつモノクローナル抗体を、複数種類組み合わせることでの HBV 感染阻止作用への影響を検討する。HBV 感染阻止作用は、上述の HepaRG を用いた検討とともに、ヒト肝細胞キメラマウスを用いても検討を行い、その効果を検証する。

4. 研究成果

細胞マイクロアレイシステムにより得られた

30 数種の抗 HBV モノクローナル抗体を用いて、抗体の生理的活性の評価を行い、また、それぞれの抗体が認識するエピトープと HBV 中和能につき検討した。その結果、HBV に対するモノクローナル抗体はさまざまな結合活性を示すものが混在していた。抗体のエピトープ部位として予想された HBV 表面蛋白抗原 (Small-HBsAg) の細胞外部位 (抗原決定基 a) を立体構造を保つ形でペプチド断片化し、抗体の結合を検討したところ、モノクローナル抗体の多くがいずれかのペプチドを認識しており、特に細胞外のループ構造部を認識するものが多く認められた。次に、HBV の感染、抗体の中和効果を in vitro で HepaRG 細胞を用いて検証した。HBV 量を調節し、感染条件を検証した結果、 2×10^4 コピーの HBV があれば HBV 感染を HBV-DNA または HBsAg 定量、HBc コア抗原の免疫染色にて確認できた。これらの感染系を用いて 30 数種のモノクローナル抗体の HBV 中和能を検討したところ、抗原決定基 a のループ構造部を認識する抗体が他の部位を認識する抗体より高い HBV 中和活性を示した。抗体の HBsAg への親和性よりも、どこのエピトープを認識するかが HBV 中和能に関与が深いと思われる。これらの知見は HB ワクチンにより誘導される抗体が HBsAg のどの部位を認識しているのかを示しており、HB ワクチンによる HBV 中和メカニズムを考える上でも興味深い知見と思われる。

さらにこれらのモノクローナル抗体の中から、異なるエピトープを認識し、in vitro での HBV 中和能の強いモノクローナル抗体を用いて検討をすすめた。モノクローナル抗体、もしくはその組み合わせによる HBV 中和効果の増強作用、さらにはヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV 中和能につき検討した。さらに、様々な genotype の HBV に対するモノクローナル抗体の中和作用につき検討した。In vitro, in vivo の HBV 中和実験では、エピトープの違うモノクローナル抗体の組み合わせにより、HBV の中和効果が増強することが判明した。さらに、HBV の中和効果の強いモノクローナル抗体、もしくはその組み合わせにより、様々な genotype の HBV が中和可能であった。

また、ワクチンエスケープミュータントとして知られる HBV G145R に対しても HBV 中和効果をモノクローナル抗体が示すことを示した。

これらの知見は HB ワクチンにより誘導される抗体による HBV 中和が、異なる genotype においても有用であることを示唆し、またエスケープミュータントに対しても有効であることを示している。今後ユニバーサルワクチンが検討されており、臨床的にも意義ある

研究成果であると思われる。また、モノクローナル抗体もしくはその組み合わせによる抗体療法の可能性も示唆するものである。

また、HBsAgの特定の部が強いHBV中和活性を示すことより、HBVの肝細胞への感染に同部位がなんらかの作用を果たしている可能性が考えられ、HBVの感染機序の解明や同部位を標的とした治療法の開発など今後につながる重要な知見であると思われる。

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4件)

- ① Jin A, Tajiri K, et al. (6人、3番目) Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array Nature Protocols 査読有、6巻 2011, 668-767
- ② Tajiri K, et al. (8人、1番目) Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. Antiviral Res 査読有、87巻 2010, 40-4
- ③ Jin A, Tajiri K, et al. (11人、3番目) A rapid and efficient single cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. Nature Medicine 査読有、15巻、2009、1088-1092
- ④ 田中靖人ら、田尻和人 (13人、9番目) ユニバーサル HB ワクチネーション：是か非か？肝臓 査読有、50巻、2009、598-604

[学会発表] (計5件)

- ① Sugauchi F, Tajiri K, et al. MODEL USING UPA/SCID MICE WITH HUMAN HEPATOCYTES TO STUDY CROSS GENOTYPE PROTECTION OF HBV AND A ROLE OF HBS ANTIGEN MUTATION IN IMMUNITY ESCAPE. The 61st Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases 2010年10月30日 Boston
- ② 田尻和人ら ユニバーサルワクチンに向けたHBワクチンの作用機序の検討 第46回肝臓学会総会ワークショップ 2010年5月27日 山形
- ③ 田尻和人ら Analysis of the epitope and neutralizing activity of monoclonal antibodies obtained from small-HBsAg vaccination. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月2日 大阪

④ Tajiri K, et al. Extracellular loop domain of small(S)-HBsAg play a major role in preventing the infection of HBV: the result from comprehensive analysis of monoclonal antibodies obtained from S-HBsAg-vaccinated healthy volunteers. 8th JSH Single Topic Conference 2009年11月22日 Tokyo

⑤ 田尻和人ら HBワクチン接種により得られたモノクローナル抗体が認識するエピトープとHBV中和能の解析 第45回肝臓学会総会ワークショップ 2009年6月4日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田尻 和人 (TAJIRI KAZUTO)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号：30512165

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし ()