

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670791

研究課題名(和文)単ドメイン抗体によるグラム陰性菌 型病原毒性の抑制探索

研究課題名(英文)Single-domain antibody against the virulence associated with the type III secretion system of gram-negative bacteria

研究代表者

佐和 貞治 (Sawa, Teiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10206013

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):高齢化社会の進行の中で、免疫力の低下した高齢者を対象に多剤耐性緑膿菌による重症肺炎が増加している。今回、緑膿菌の主要な病原性である 型分泌システムを阻害できるモノクローナル抗体 m166のハイブリドーマ細胞よりクローニングした抗体遺伝子をテンプレートとして、遺伝子遺伝子組換え抗PcrV単鎖抗体scFv::m166-HLLを作成した。さらにこの抗体をヒト化する改変を加えて、緑膿菌肺炎の予防・治療薬として気管内投与による効果をマウス緑膿菌肺炎モデルで検討した。この研究を通じて、細菌性肺炎に対する吸入抗体医薬品としての遺伝子組換え単鎖抗体の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): *Pseudomonas aeruginosa*, a gram-negative pathogen, causes life-threatening infections. The Pseudomonas type III secretion system functions as a molecular syringe to deliver type III secretory toxins directly into the cytosol of eukaryotic cells, and also acts to inhibit innate immune mechanisms, thereby preventing bacterial clearance. Antibodies against PcrV, the cap structure in the translocational needle of the type III secretory apparatus of *P. aeruginosa*, block TTS toxin translocation. We investigated the therapeutic use of a recombinant anti-PcrV single-chain antibody. We synthesized a recombinant single-chain antibody, in which the heavy (VH) and light chain (VL) variable regions of the anti-PcrV monoclonal IgG are joined by a flexible peptide linker. The functions of this synthetic antibody were tested, and future potentiality for clinical use was evaluated. Promising preliminary data about inhalational antibody therapy against bacterial pneumonia was obtained in this study.

研究分野：集中治療医学

キーワード：緑膿菌 細菌性肺炎 抗体医療 酸型分泌システム PcrV 単鎖抗体 遺伝子組換え

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム医学や分子細菌学の進歩により、多くの病原性細菌の病原性メカニズムや薬剤耐性機構が分子レベルで明らかにされてきた。特に1990年代半ばより、グラム陰性菌の病原性と関わるメカニズムとして発見されたⅢ型分泌システムは、従来までに同定されていたⅡ型やⅣ型分泌とは異なり、特殊な分泌装置を通じてエフェクターと呼ばれるタンパク毒素を直接、細胞質内へ転移させることで組織傷害を引き起こす。この病原性メカニズムに対抗するためには、毒素タンパクをワクチンと用いることや、毒素タンパクそのものに対する抗体療法は無効である。一方、かつて我々は緑膿菌性肺炎における急性肺傷害発生のメカニズムにⅢ型分泌やその毒素が深く関わっていることを発見し (Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. *J Clin Invest* 104:743, 1999, Sato H, Sawa T, et al. *EMBO J* 22:1, 2003, Pankhaniya RR, Sawa T, et al. *Crit Care Med* 32:2293, 2004), このⅢ型分泌の転移が分泌装置の先端に位置するキャップタンパクへの特異抗体により阻害できることを発見した (Sawa T, et al. *Nat Med* 5:392, 1999)。Ⅲ型分泌装置は、細菌側の二重膜上の基底構造、ニードル状突起構造、標的細胞の原形質膜を越える転移機構で構成される。ニードル状突起の先端においてキャップ状の構造をとるタンパク質は、近年の結晶化解析の結果 (Broz P, et al. *Mol Microbiol* 65:1311-20, 2007)、5量体となって細胞膜で転移孔を形成すると考えられ、ペスト菌では歴史的にV抗原と呼ばれるワクチン抗原に相当し、Ⅲ型分泌毒素の転移に関わっている。緑膿菌では、このキャップタンパクはPcrVと呼ばれ、PcrVに対する特異抗体は毒素の転移を阻害できることから、我々が開発したモノクローナル抗PcrV抗体mab166 (Frank DW, Sawa T, et al. *Infect Dis* 186:64, 2002) はヒト化 (humanized) (Baer M, Sawa T, et al. *Infect Immun* 77:1083, 2008) されて、緑膿菌感染予防・治療として、米国並びにヨーロッパにて臨床試験に至っている (François B, et al. *Crit Care Med* 40:2320, 2012; Milla CE, et al. *Pediatr Pulmonol.* 49:605, 2014)。また、近年、我々は非特異的なγ-グロブリンにもPcrV抗体価に応じた予防治療効果があることを報告した (Katoh H, Sawa T, et al. *Crit Care Med* 44:e12, 2016; Shimizu M, Sawa T, et al. *J Infect Chemother* 22:240, 2016; Kinoshita M, Sawa T, et al. *Hum Vaccin Immunother* 2016 Jul 25:1)。

## 2. 研究の目的

これら抗PcrV抗体によるⅢ型分泌阻害は、分泌装置先端への結合による毒素通過阻害作用と考えられ、抗体Fc部分を含む抗体分子の定常領域の存在は必要でなく、Fab部分 (あるいはF(ab)<sup>2</sup>)のみで達成できる。Fab抗体は静脈投与の場合にその短い血中半減期が問題となるが、この抗PcrV体は肺内投与によりⅢ型分泌毒性に対する強力な効果を発揮できる (Faure K, Sawa T, et al. *J Immune Based Ther Vaccines* 1:2, 2003)。そこで今回、従来の抗菌薬とはまったく異なるメカニズムで緑膿菌性肺炎を治療・予防を達

成できる医薬品開発を目標として、ヒト化遺伝子組み換え短鎖抗PcrV抗体 (scFv::m166-HLL) を作成し、緑膿菌性肺炎の予防・治療を考えた肺内投与 (もしくは吸入) できる抗体医薬品としての開発につなげる。

## 3. 研究の方法

既存のPcrVモノクローナル抗体m166のハイブリドーマ細胞からクローニングした抗体遺伝子DNA配列から得られる抗体タンパクのアミノ酸配列に対して、合成オリゴDNAプライマーを設計し、polymerase-chain reactionを用いて段階的にDNA配列を改変し、単鎖アミノ酸配列へ改変する (Sawa T, et al. *Hum Vac Immunother* 10:2843, 2014)。改変したscFv抗体遺伝子は、大腸菌発現ベクターpBAD/gIII (Thermo Fisher Sci., USA) の発現クローニングサイトにはめ込む。なお、pBAD/gIIIベクターでは、gene III signal sequence配列を発現タンパクN末端に配置することで、発現されたタンパクが大腸菌の内膜と外膜の間のperiplasmに分泌される。このことで、periplasmに存在するDsbA酵素のより、H鎖及びL鎖の一箇所ずつに存在するS-S結合が作られて、抗体立体構造ができる。Periplasmに分泌されたタンパクは浸透圧ショック法により容易に回収が可能となる。また、このベクターはタンパク精製用の6xHisタグ、並びに認識用のmycタグをC末端に備えている。タンパク精製は、固定化金属イオン(Ni<sup>2+</sup>)アフィニティー法で精製を行う。スモール・スケールでタンパク発現・精製を行い、抗原への結合親和性を免疫プロット法やELISA法 (もしくは表面プラズモン共鳴による生体分子間相互作用解析システム) にてこれまでに既に得られたマウスm166 IgG抗体と比較検証しながら、実験計画を進める。

## 4. 研究成果

改変した抗体遺伝子大腸菌分泌型タンパク発現ベクターであるpBAD/gIIIのAraCプロモータ及びバクテリオファージfd gene III proteinのリーダーペプチド下流のクローニングサイトにはめ込んだ。大腸菌株LMG194を形質転換させ、L-アラビノースで発現誘導して分泌型タンパクとして大腸菌のperiplasmに分泌集積させて浸透圧ショックにて溶出させて、C末端側ヘキサヒスチジンタグを利用して、IMACカラムにてアフィニティー精製した。精製したscFv::hu166-HLLについて、抗原への結合性等をcompetitive ELISA法でオリジナル抗体m166との比較により確認した。祖の結果、生成した探索抗体は、PcrV抗原を認識した。今後、in vitroでの細菌に対する毒素分泌阻害作用や動物での吸入投与等について検討を加えてゆきたい。

## 5. 主な発表論文等 (雑誌論文) (計23件)

1. Kainuma A, Momiyama K, Kimura T, Akiyama K, Inoue K, Naito Y, Kinoshita M, Shimizu M, Kato H, Shime N, Fujita N, **Sawa T**. An outbreak of fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST357 harboring the *exoU* gene. *J Infect Chemother*, 査読有り, 2018 Apr 5. pii: S1341-321X(18)30086-2.
2. Hamaoka S, Niato Y, Katoh H, Shimizu M, Kinoshita M, Kainuma A, Akiyama K, Moriyama K, Ishii KJ, **Sawa T**. Efficacy comparison of adjuvants in PcrV vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Microbial Immunol*, 査読有り, 2017 61(2):64-74.
3. **Sawa T**, Hamaoka S, Kinoshita M, Kainuma A, Niato Y, Akiyama K, Kato H. *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU and its predicted homologs. *Toxins*, 査読有り, 2016, 8(11). pii: E307
4. Kinoshita M, Kato H, Yasumoto H, Shimizu M, Hamaoka S, Naito Y, Akiyama K, Moriyama K, **Sawa T**. The prophylactic effects of human IgG derived from sera containing high anti-PcrV titers against pneumonia-causing *Pseudomonas aeruginosa*. *Hum Vaccin Immunother*, 査読有り, 2016, 12(11):2833-2846.
5. **Sawa T**, Naito Y, Katoh H, Amaya F. Cellular stress responses and monitored cellular activities. *Shock*, 査読有り, 2016, 9: 113-121.
6. Yasumoto H, Katoh H, Kinoshita M, Shimizu M, Hamaoka S, Akiyama K, Naito Y, **Sawa T**. Epidemiological analysis of serum anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV titers in adults. *Microbiol Immunol*, 査読有り, 2016, 60(2):114-20.
7. Shimizu M, Katoh H, Hamaoka S, Kinoshita M, Akiyama K, Naito Y, **Sawa T**. Protective effects of intravenous immunoglobulin and antimicrobial agents on acute pneumonia in leukopenic mice. *J Infect Chemother*, 査読有り, 2016, 22(4):240-7, 2016.
8. Katoh H, Yasumoto H, Shimizu M, Hamaoka S, Kinoshita M, Akiyama K, **Sawa T**. IV Immunoglobulin for acute lung injury and bacteremia in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med*, 査読有り, 2016, 44(1):e12-24.
9. 内藤慶史, **佐和貞治**. 多剤耐性緑膿菌に対する免疫療法. *医学のあゆみ*, 査読無し, 2018, 264(5):444-449, 2018.
10. **佐和貞治**. 緑膿菌感染症に対する能動、受動免疫療法. 第51回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p.20-23, ISSN1340-6477.
11. 甲斐沼篤, 秋山浩一, 内藤慶史, 木下真央, 濱岡早枝子, 加藤秀哉, **佐和貞治**. 臨床分離緑膿菌株のMLST法による遺伝子解析. 第51回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p92-95. ISSN1340-6477.
12. 木下真央, 甲斐沼篤, 内藤慶史, 秋山浩一, 濱岡早枝子, 清水優, 加藤秀哉, **佐和貞治**. 各種グラム陰性細菌V抗原抗体価の疫学調査. 第51回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2017, p96-97. ISSN1340-6477.
13. **佐和貞治**, 濱岡早枝子, 内藤慶史, 秋山浩一, 木下真央, 清水優, 加藤秀哉, 森山潔. 緑膿菌型分泌とV抗原ワクチンの開発. 第50回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 67-71. ISSN1340-6477.
14. 木下真央, 加藤秀哉, 清水優, 濱岡早枝子, 秋山浩一, 内藤慶史, **佐和貞治**. マウス緑膿菌性急性肺障害モデルにおけるPcrVに対して高力価の免疫グロブリンGの効果. 第50回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 132-136, ISSN1340-6477.
15. 森山潔, **佐和貞治**. 消化管穿孔患者における集中治療室での緑膿菌抗PcrV抗体価の推移. 第50回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 137-139. ISSN1340-6477.
16. 濱岡早枝子, 加藤秀哉, 内藤慶史, 清水優, 安本寛章, 木下真央, 秋山浩一, **佐和貞治**. 緑膿菌の遺伝子組み換えV抗原に各種アジュバントを添加したワクチンの有効性. 第50回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2016, p. 140-144. ISSN1340-6477.
17. **佐和貞治**, 加藤秀哉, 清水優. 感染症治療薬の新しい試み. 難治性感染症に期待される抗菌免疫療法 化学療法の領域, 査読無し, 2016, 32(1):96-106.
18. 秋山浩一, 清水優, 濱岡早枝子, 木下真央, 安本寛章, 加藤秀哉, 木村武史, 藤田直久, **佐和貞治**. 複数剤耐性緑膿菌分離株の型分泌毒素遺伝子型解析. 第49回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2015, p. 79-83. ISSN1340-6477.
19. 清水優, 加藤秀哉, 木下真央, 濱岡早枝子, 秋山浩一, 安本寛章, **佐和貞治**. 多剤耐性緑膿菌臨床株の病原毒性評価. 第49回緑膿菌感染症研究会公演記録, 査読無し, 2015, p. 88-93. ISSN1340-6477.
20. **佐和貞治**. 緑膿菌性急性肺傷害に対する分子標的治療. 麻酔, 査読無し, 64(増刊): 5078-5084, 2015.
21. **佐和貞治**, 加藤秀哉, 安本寛章, 清水優, 濱岡早枝子, 木下真央, 秋山浩一. 緑膿菌の主要肺傷害因子 -パタチン様ホスホリパーゼA2-型分泌毒素ExoU-. 京都府医大誌, 査読有り, 2015, 124(7),475-487.
22. **佐和貞治**, 加藤秀哉. 細菌の分泌装置-緑膿菌を中心に-. *Surgery Frontier*, 査読無し, 2015, 22:56-61.
23. **佐和貞治**. 手術室における感染予防. 感染予防のための麻酔管理-整形外科医と

麻酔科医の間での知識の共有. 日本骨・関節感染症学会雑誌, 査読無し, 2015, 28:17-21, 2015.

(学会発表) (計 11 件)

1. Kainuma A, Akiyama K, Naito Y, Momiyama K, Inoue K, Kinoshita M, Kato H, **Sawa T**. The single sequence type pandemic of clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital, Japan. 16<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas*, Liverpool, UK, Sep 5-9, 2017.
2. Naito Y, Hamaoka S, Kainuma A, Kato H, Ishii JK, **Sawa T**. Intranasal PcrV vaccination protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. ASM Microbe 2017, June 1, 2017, New Orleans, Louisiana, USA
3. Hamaoka S, Naito Y, Kato H, Kainuma A, **Sawa T**. The Association Between Anti-Pcrv Titers And Protective Effects Against *P. aeruginosa* In Pcrv Vaccinated Mice. May 6, 2017, International Anesthesia Research Society Annual Meeting and International Symposium 2017, at the Grand Hyatt Washington in Washington, DC
4. Kainuma A, Momiyama K, Akiyama K, Naito Y, Kinoshita M, Kato H, **Sawa T**. Epidemic propagation of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 clones harboring *exoU* gene. Association of University Anesthesiologists, 64th Annual Meeting, May 4, 2017, at the Grand Hyatt Washington in Washington, DC
5. **Sawa T**. Mitochondrial Stress and Outcomes in Septic Patients: Mitochondrial *stress* and *Pseudomonas* infections. IARS 2016 Annual Meeting and International Science Symposium, May 21 - 24, at the Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, California, May 21, 2016
6. **佐和貞治**. 教育講演 緑膿菌感染症に対する能動、受動免疫療法. 第 53 回緑膿菌感染症研究会 2017 年 2 月 10 日. 大分.
7. **佐和貞治**. 招待講演 感染症スペシャリストが説きあかす難治性病原体の秘密. 緑膿菌性細胞上皮傷害の分子病態メカニズム. 角膜カンファレンス 2017 2017 年 2 月 17 日. 福岡.
8. **佐和貞治**. シンポジウム 病原因子と病態の接点を求めて. 緑膿菌ワクチンの開発. 第 50 回緑膿菌感染症研究会. 2016 年 2 月 6 日, 東京.
9. **佐和貞治**. 緑膿菌肺炎に対する グロブリンの効果. ランチョンセミナー. 第 38 回呼吸療法医学会学術集会, 名古屋国際会議場, 2016 年 7 月 16 日
10. **佐和貞治**. 緑膿菌性肺炎とガンマグロブリン製剤の新規効用のメカニズム. ランチョンセミナー. 第 31 回日本 Shock 学会総会 2016 年 10 月 6 日. 東京.
11. **佐和貞治**. 緑膿菌 V 抗原に対する血清抗体価の疫学と緑膿菌性肺傷害に対する保護作

用の検討. 第 20 回日本ワクチン学会学術集会. 2016 年 10 月 22 日 東京.

(図書) (計 2 件)

1. **Sawa T**, Kainuma A, Moriyama K, Naito Y. Construction of a recombinant single-chain antibody fragment against bacterial type III secretion. *Antibody Engineering*, ISBN 978-953-51-3825-9-1 InTech, doi: 10.5772/intechopen.70316.
2. Naito Y, Moriyama K, **Sawa T**. Anti-PcrV Immunization for *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Cystic Fibrosis, *Progress in Understanding Cystic Fibrosis*, Dr. Dinesh Sriramulu (Ed.), InTech, ISBN 978-953-51-3291-2 doi: 10.5772/intechopen.69767.

(産業財産権)

出願状況 (計 1 件)

名称: 病原性グラム陰性菌に対するワクチン  
発明者: 佐和貞治、石井建、濱岡早枝子、内藤慶史  
権利者: 京都府公立大学法人、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 PCT/JP2018/003991  
出願年月日: 2017 年 2 月 6 日  
国内外の別: 国内, 海外

(その他)

ホームページ等:

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anesth/index.php?TeijiSawa>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐和 貞治 (Sawa Teiji)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10206013

(2) 研究分担者

天谷 文昌 (Amaya Fumimasa)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60347466

(3) 研究分担者

中嶋 康文 (Nakajima Yasufumi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70326239