

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390286
 研究課題名（和文）「リンパ球チップ」を用いた感染症・細菌兵器に対する新たな抗体医療戦略
 研究課題名（英文） A new strategy for antibody-therapy against infectious diseases and bacterial terrorism using lymphocyte-chip
 研究代表者
 村口 篤（MURAGUCHI ATSUSHI）
 富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
 研究者番号：20174287

研究成果の概要（和文）：

我々が開発したリンパ球チップの応用として、マイクロウェル内の抗体分泌細胞の分泌する抗体を直接検出する方法（ISAAC/FLISPOT）法をマウスの実験系で開発し、この系をヒトに応用して、ワクチン接種したボランティアの末梢血から、肝炎ウイルスとインフルエンザウイルスに対する高品質のヒト抗体を極めて迅速（1週間以内）に作製することに成功した。また、B型肝炎ウイルス（HBV）のin vitro迅速中和能検定法を開発し、ヒト抗HBs抗体が認識するHBs抗原のエピトープとHBV中和能との連関を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We developed ISAAC(Immunospot assay for antibody-secreting cell) method that can detect antibody-secreting cells in a microwell using murine system. We then succeeded in generating high-quality human monoclonal antibodies for hepatitis B virus and influenza virus from vaccinated healthy volunteers using the ISAAC method in a very short time; within one week. We further developed an in vitro assay system to examine the HBV-neutralizing activity of human anti-HBs antibodies and clarified the relationship between neutralizing activity of human mAbs and epitopes of HBs antigen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：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：リンパ球チップ、抗体医療、抗体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

抗生物質・ワクチンの開発・公衆衛生の向上により、多くの感染症が制圧可能となってきたが、近年では、SARS、トリインフルエンザ、エイズなどの新興・再興感染症や日和見

感染症、持続・潜伏感染症、さらに天然痘などの細菌兵器が、人類にとっての新たな脅威となってきている。

我々は、抗原特異的なリンパ球をチップに同定し、それを回収することで、個々の細胞の遺伝子解析、特に抗体遺伝子解析が

できるのではないかという発想で、工学系のグループと共同で、独自のマイクロウェルチップを作製し、1個1個のリンパ球クローンを刺激する新しいデバイスの開発を試みた。その結果、1ウェルのサイズが10 μm で、このウェルにリンパ球1個をトラップし、10万個のリンパ球を数分で網羅的に解析できる画期的なシステム（リンパ球マイクロウェルチップ：図1）の構築に世界で初めて成功した。

リンパ球チップの完成に続き、我々はヒト抗原特異的 B 細胞の同定とリコンビナント抗体の作製法を確立した。すなわち、患者の B リンパ球をマイクロチップに播種し、抗原で刺激し、細胞内 Ca の上昇をスキャナーで解析することで抗原特異的 B リンパ球を検出、回収し、回収した1個の B リンパ球から抗体遺伝子を取得するシステムである。本システムは世界初であり、抗体医療の開発に極めて有用と考えられている。

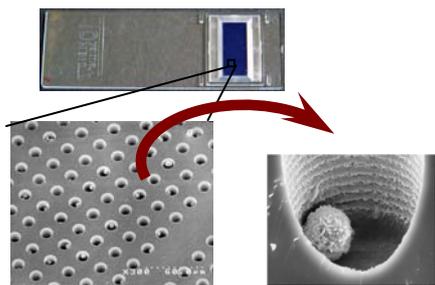


図1 リンパ球マイクロウェルチップ
20-100万個のウェルに、リンパ球1個を補足し、生きた1個ずつの細胞機能を網羅的に調べることが可能である。

2. 研究の目的

本研究は、我々が開発した「リンパ球チップ」という新しい抗体医療戦略を用いて、感染症患者の血液から病原菌特異的なヒトBリンパ球を効率良く同定し、そのBリンパ球が産生する抗体遺伝子を迅速に単離し、ヒト型リコンビナント抗体を1週間以内に作製することで、新興感染症や細菌を用いた生物テロに対する新しい抗体医療の道を開くことを目的とする。

3. 研究の方法

【1】抗体分泌細胞の直接検出（ISAAC/FLISPOT）法の開発と実証：抗原刺激による1細胞内のCa濃度の変化の検出は、抗原に対する個々のリンパ球応答を検知する有用な手段であるが、リンパ球チップの応用として、マイクロウェル内の抗体分泌細胞の分泌する抗体を直接検出する方法が考えられる。例えば、細胞が分泌する抗体を蛍光色素標識した抗原で検出すれば、この細胞を回収し、抗原特異的な抗体遺伝子候補をクローニングできる。我々は、すでに前実験において、HEL（鶏卵リゾチーム）抗体トランスジェニックマウス（MD4）の脾細胞をHELで刺激し、HEL抗体分泌細胞を高感度かつ効率的に検出できるデータを得ている。この系をヒト末梢血の抗体産生細胞の検出に応用するため、ヒトのISAAC/FLISPOT法を開発する。

【2】B型肝炎ウイルス（HBV）の迅速中和能検定法の開発：HBVはヒトとチンパンジーの肝細胞でのみ増殖するため、HBVの中和実験にはヒトの初代肝細胞が必要であり、測定は容易ではない。近年、肝臓にヒト肝細胞を移植し、ほとんどの細胞がヒト由来になった実験モデルマウスが開発されているが、高価であり判定に時間を要する。本研究では、ヒト肝細胞癌由来のHepaRG細胞株を用いて、短期間にin vitroでHBVの中和能がアッセイできる系を確立する。すなわち、HepaRG細胞株にHBVを抗体の存在下あるいは非存在下で感染させ、細胞内あるいは培養液中のHBVウイルス量の変化をリアルタイムPCR法で調べる。この方法が感染すれば、上記で得られた多くのヒト型抗HBV抗体の中和能を効率良く調べることができる。

【3】リンパ球チップによるB型肝炎ウイルス、インフルエンザ特異的ヒト抗体の作製：HBs ワクチン、インフルエンザワクチン接種した健常人をボランティアとし、リンパ球チップを用いて抗原特異的 B リンパ球の同定（CCD法およびISAAC/FLISPOT法）および抗体遺伝子解析を行う。IgG抗体の取得を目指し、B細胞分画からCD19⁺、CD138⁺細胞を濃縮して、CCDあるいはISAAC/FLISPOT法で検出する。次に、大学附属病院および関連病院から、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、インフルエンザ患者の末梢血を得て、抗原特異的Bリンパ球をCCD法、あるいは、ISAAC/FLISPOT

法で同定し、ヒトリコンピナント抗体を10種類以上、取得する。

【4】ヒト型抗体が認識するHBs抗原エピトープの決定:HBVの感染には、HBVのエンベロップ蛋白が関与するが、ヒト抗体が認識できる部位(抗原エピトープ)についての詳細な検討はなされていない。特に、抗原エピトープと中和抗体の関連については未解決である(図2)。我々は、得られた抗HBV抗体を用いて抗原エピトープの解析を行う。HBs抗原の抗原決定基aはアミノ酸配列(cktctipaqgtsmfpscctkpsdgnctci)であることが報告されているので、合成ポリペプチド(連続する約15アミノ酸)を用いて、それぞれのペプチドに結合し得る抗体(競合実験を含む)を調べ、エピトープとHBV中和能との連関を明らかにする。

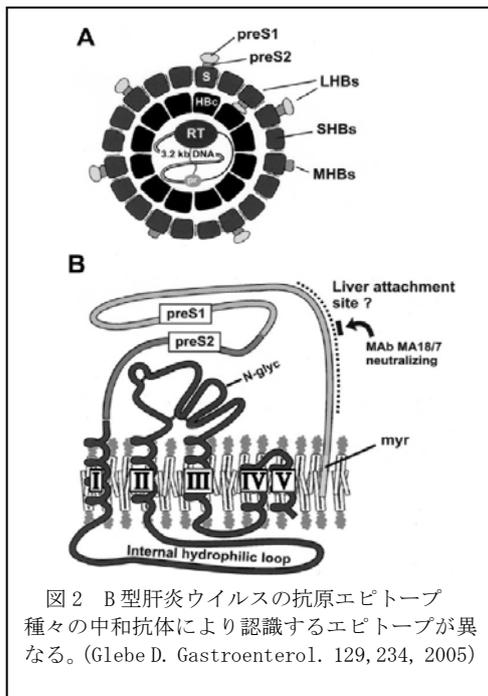


図2 B型肝炎ウイルスの抗原エピトープ種々の中和抗体により認識するエピトープが異なる。(Glebe D. Gastroenterol. 129, 234, 2005)

4. 研究成果

【1】抗体分泌細胞の直接検出 (ISAAC/FLISPOT) 法の開発と実証:リンパ球チップの応用として、マイクロウェル内の抗体分泌細胞の分泌する抗体を直接検出する方法を確立した(図3)。具体的には、細胞が分泌する抗体を、蛍光色素標識した抗原で検出し、この細胞を回収後、抗原特異的な抗体遺伝子候補をクローニングできるシステムを構築した。このシステムで、

HEL(鶏卵リゾチーム)抗体トランスジェニックマウス(MD4)の脾細胞から、HEL抗体分泌細胞を高感度かつ効率的に検出することを実証した。

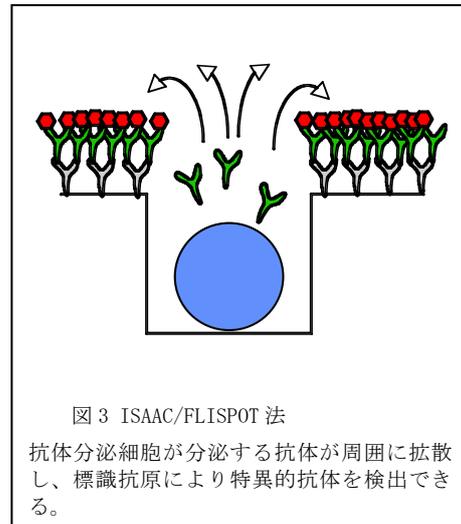


図3 ISAAC/FLISPOT 法

抗体分泌細胞が分泌する抗体が周囲に拡散し、標識抗原により特異的抗体を検出できる。

さらに、この系をヒトに応用して、後述するように、ワクチン接種したボランティアの末梢血から、肝炎ウイルスあるいはインフルエンザウイルスに対する抗体を迅速に作製すること成功し、ISAAC法の臨床応用を実証した。

【2】B型肝炎ウイルス(HBV)の迅速中和能検定法の開発:HBVはヒトとチンパンジーの肝細胞でのみ増殖するため、HBVの中和実験にはヒトの初代肝細胞が必要であり、測定は容易ではない。今回、ヒト肝細胞癌由来のHepaRG細胞株を用いて、短期間でin vitroでHBVの中和能がアッセイできる系を確立した。具体的には、HepaRG細胞株にHBVを抗体の存在下あるいは非存在下で感染させ、細胞内あるいは培養液中のHBVウイルス量の変化をリアルタイムPCR法で調べた。この方法により、上記【1】で得られた多くのヒト型抗HBV抗体の中和能を効率良く調べることができた。

【3】リンパ球チップによるB型肝炎ウイルス、インフルエンザ特異的ヒト抗体の作製:HBsワクチン、インフルエンザワクチン接種した健常人をボランティアとし、リンパ球チップを用いて抗原特異的Bリンパ球の同定(CCD法およびISAAC/FLISPOT法)および抗体遺伝子解析を行った。IgG抗体の取得を目

指し、B細胞分画から CD19+, CD138+細胞を濃縮して、CCDあるいはISAAC/FLISPOT法で検出した。この方法により、B型肝炎ウイルス、インフルエンザ特異的ヒト抗体に対するヒトリコンビナント抗体を10種類以上、取得した。

【4】ヒト型抗体が認識するHBs抗原エピープの決定:HBVの感染には、HBVのエンベロープ蛋白が関与するが、ヒト抗体が認識できる部位(抗原エピープ)についての詳細な検討はなされていない。特に、抗原エピープと中和抗体の関連については未解決である。我々は、【3】の研究により、リンパ球アレイ法を用いて40種類以上のヒト抗HBV抗体を得ることができた。そこで、これらの抗体を用いて抗原エピープの解析を行った。HBs抗原の抗原決定基aはアミノ酸配列(cktctipaqg tsmfpscct kpsdgnctci)であることが報告されているので、合成ポリペプチド(連続する約15アミノ酸)を用いて、それぞれのペプチドに結合し得る抗体(競合実験を含む)を調べ、エピープとHBV中和能との関連を明らかにした(図4)。

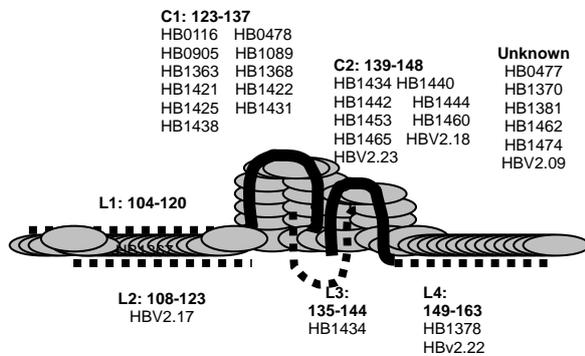


図4 ヒト抗HBV抗体が認識するHBsの抗原エピープ

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22件)

1. Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Lin Z., Obata T., Ishida I., Kishi H., and Muraguchi A.: Generation of TRAIL-receptor 1-specific human monoclonal Ab by a combination of immunospot array assay on a chip and human Ab-producing mice. Eur. J. Immunol., 40:

3591-3593, 2010. (査読有)

2. Tajiri K., Ozawa T., Jin A., Tokimitsu Y., Minemura M., Kishi H., Sugiyama T., and Muraguchi A.: Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. Antiviral. Res., 87: 40-49, 2010. (査読有)
3. Lin Z., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Ishida I., Jin F., Kishi H., and Muraguchi A.: Post-translational modification of TRAIL receptor type 1 on various tumor cells and the susceptibility of tumors to TRAIL-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 395: 251-257, 2010. (査読有)
4. Jin A.-S., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., Kishi H., and Muraguchi A.: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. Nat. Med., 15: 1088-1092, 2009. (査読有)
5. Kinoshita K., Ozawa T., Tajiri K., Kadowaki S., Kishi H., and Muraguchi A.: Identification of antigen-specific B cells by concurrent monitoring of intracellular Ca²⁺ mobilization and antigen binding with microwell array chip system equipped with a CCD imager. Cytometry Part A, 75A: 682-687, 2009. (査読有)
6. Tajiri K., Kishi H., Ozawa T., Sugiyama T., and Muraguchi A.: SFMAC: A novel method for analyzing multiple parameters on lymphocytes with a single fluorophore in cell-microarray system. Cytometry Part A, 75A: 282-288, 2009. (査読有)
7. Ozawa T., Kinoshita K., Kadowaki S., Tajiri K., Kondo S., Honda R., Ikemoto M., Piao L.-X., Morisato A., Fukurotani K., Kishi H., and Muraguchi A.: MAC-CCD system: a novel lymphocyte microwell-array chip system equipped with CCD scanner to generate human monoclonal antibodies against influenza virus. Lab on a Chip, 9: 158-163, 2009. (査読有)

[学会発表] (計37件)

1. Muraguchi A., Ozawa T., Jin A., Tajiri K., Takemoto M., Okuda T., Shiraki K., and Kishi H.: Characterization of human anti-influenza M2 antibody obtained from peripheral blood of vaccinated volunteer. Keystone Symposia, 2011, 2, 6-11, Keystone, USA.
2. Ozawa T., Jin A., Tajiri K., Takemoto M., Okuda T., Shiraki K., Kishi H., and Muraguchi A.: Isolation and characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of

- influenza A virus. Cold Spring Harbor Conferences Asia, 2010, 11, 7-10, Suzhou, China.
3. Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Lin Z., Kishi H., and Muraguchi A.: Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-receptor 1 specific human mAbs generated by Immunospot array assay on a chip. Cold Spring Harbor Conferences Asia, 2010, 11, 7-10, Suzhou, China.
 4. Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Lin Z., Obata T., Ishida I., and Muraguchi A.: Enhancement of TRAIL-induced apoptosis with novel TRAIL-R1-specific human mAbs generated by immunospot array assay on a chip. 14th International Congress of Immunology, 2010, 8, 22-27, Kobe.
 5. Ozawa T., Jin A., Tajiri K., Shiraki K., Kishi H., and Muraguchi A.: Characterization of human anti-influenza M2 antibody obtained from peripheral blood of vaccinated volunteer. 14th International Congress of Immunology, 2010, 8, 22-27, Kobe.
 6. Kishi H., Tajiri K., Hatakeyama S., Kobayashi E., Horii M., Jin A., Ozawa T., and Muraguchi A.: Detection of antigen-specific T-cell response on the single cell-basis with microwell array chip. 4th Measuring Antigen-Specific Immune Response (MASIR) Conference, 2010, 6, 9-12, Mykonos, Greece.
 7. 小澤龍彦, 金 艾順, 田尻和人, 小幡 勤, 近藤佐千子, 木下耕史, 門脇慎一, 高橋和郎, 杉山敏郎, 岸 裕幸, 村口 篤: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009, 12, 9-12, 横浜.
 8. Jin A.-S., Ozawa T., Tajiri K., Kishi H., and Muraguchi A.: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. IBC's 20th Annual International Conference Antibody Engineering, 2009, 12, 6-10, San Diego, USA.
 9. 岸 裕幸, 小澤龍彦, 田尻和人, 村口 篤: 単一細胞レベルにおける B 細胞受容体シグナル解析. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12, 2-4, 大阪.
 10. 小澤龍彦, 田尻和人, 金 艾順, 岸 裕幸, 村口 篤: Isolation of human anti-influenza M2 antibody from peripheral blood of healthy volunteer. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12, 2-4, 大阪.
 11. 金 艾順, 小澤龍彦, 田尻和人, 岸 裕幸, 村口 篤: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 2009, 12, 2-4, 大阪.
 12. Tajiri K., Ozawa T., Jin A.-S., Tokimitsu Y., Nakayama Y., Minemura M., Kishi H., Sugiyama T., and Muraguchi A.: 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 individuals. The 8th JSH Single Topic Conference, 2009, 11, 21-22, Tokyo.
 13. Kinoshita K., Kishi H., Fukurotani K., Honda R., Ozawa T., Tajiri K., and Muraguchi A.: B-cell receptor signal analysis at single cell levels using a microwell-array chip. Cold Spring Harbor Meeting, 2009, 11, 11-14, New York.
 14. Kishi H.: Microwell arrays for detecting single, antigen-specific B-lineage cells. IBC's 19th Annual International Conference Antibody Engineering, 2008, 12, 7-11, San Diego.
 15. 岸 裕幸, 田尻和人, 小澤龍彦, 金 艾順, 村口 篤: マイクロウェルアレイチップを用いた抗原特異的 T 細胞の検出. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 2008, 12, 1-3, 京都.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
村口 篤 (MURAGUCHI ATSUSHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号: 2 0 1 7 4 2 8 7
 - (2) 研究分担者
岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号: 6 0 1 8 6 2 1 0
小澤 龍彦 (OZAWA TATSUHIKO)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号: 1 0 4 3 2 1 0 5
北島 勲 (KITAJIMA ISAO)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号: 5 0 2 1 4 7 9 7
二階堂 敏雄 (NIKAIDO TOSHIO)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号: 5 0 1 8 0 5 6 8
 - (3) 連携研究者 (なし)