

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790960

研究課題名(和文) リボソームディスプレイによるヒト型抗インフルエンザ H5N1 抗体作製と高親和性化

研究課題名(英文) Isolation of anti-H5N1 human monoclonal antibody by ribosome display

研究代表者

上地 玄一郎 (UECHI GENICHIRO)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：10420647

研究成果の概要(和文)：

本研究の目的はリボソームディスプレイ法を用いて H5N1 インフルエンザウイルス抗原特異的に結合するヒト型抗 H5N1 インフルエンザ抗体を単離し、その中和活性やエпитープを同定することである。合計 1200 個の大腸菌コロニーから 12 個の scFv タンパクが H5N1 抗原に対して結合能を示した。12 クローンの中の中和活性を測定したところ 11 クローンは中和活性を示さなかったもしくはとても弱かったが 1 クローンのみ 62 μ g/ml (2.5 nM) の濃度で H5N1 A/Vietnam/31244/07 株に対して中和活性を示した。組換え HA タンパクを用いた ELISA 法により中和活性を有する scFv 抗体はヘマグルチニンタンパクと結合することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study is isolating H5N1 neutralizing human that recognize H5N1 antigen specifically and characterize its neutralizing activity and determine epitope.

After three round of panning, concentrated scFv genes were ligated into *E. coli* expression vector and total 1200 colonies were picked up and scFv expression level was analyzed by ELISA. Total 12 of 30 scFvs showed binding activity against recombinant Hemagglutinin protein of H5N1. The twelve scFvs were cultured in large scale and obtained about 6mg from 1L culture scale. Total 1 of 12 sample showed neutralizing activity against A/Vietnam/31244/07 strain at the concentration of 62 μ g/ml (2.5 nM). This scFv antibody recognized recombinant HA specifically, now escape mutant analysis is on going.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

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：感染症治療学

1. 研究開始当初の背景
 オルソミクソウイルス科に属する A 型インフルエンザウイルスは、その表面に 2 種類のスパイク構造物をもっている。その構造物

はヘマグルチニン (hemagglutinin、HA、赤血球凝集素) とノイラミニダーゼ (neuraminidase、NA) という二種類の糖蛋白が各々 3 量体、4 量体を形成している。HA

タンパクは、主要な感染防御抗原であり、感染宿主に中和抗体産生を誘導する。

A型インフルエンザウイルスは鳥類と哺乳動物にも感染し、人獣共通感染症である。2003年から2006年のベトナムでの流行により93名の感染者を出した後、小康状態を保っていたが2007年5月下旬より北部ベトナム5省において13人のH5N1感染患者が発生し、その内10名が死亡している（致死率76.9%）。

ベトナムにおいては通常のウイルスに比べて700倍もタミフル耐性を示すウイルスが確認されており（Mai et al. Nature, 437, 7062, 2005）、今後耐性化が懸念されるため新たな治療薬の開発が切望されている。またこれらの医薬品は大量備蓄することは難しいため日本独自の技術でH5N1に対処する方法を構築する必要がある。他のH5N1対策としてワクチン接種があり、各国の研究機関が取り組んでいるものの、効果や安全性の確立中でありまだ実用化には達していない。1918年のスペイン風邪流行時に患者血清を用いた血清療法が効果を示したことなどからH5N1インフルエンザに対する治療法として抗体療法は有効な選択肢の一つと思われる。（Luke et al, Ann Intern Med., 145, 599-609, 2006）

申請者は長崎大学の新興・再興感染症疫学研究拠点（ベトナム拠点）にて研究に従事しており山城教授の基盤研究C『高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）感染に対する治療用ヒト抗体製剤開発の研究（課題番号18591120）』の元でコンビナトリアルバイオロジーであるファージディスプレイ法を用いたH5N1に対するヒト型抗体の研究に参画し、研究知見および研究体制の面で必要十分な研究体制下におき、必要時には助言及び研究支援が迅速に得られる状況である。今年度までの基盤整備の結果、ベトナム国立衛生疫学研究所 National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)内にBSL2およびBSL3研究室と実験機器を整備した。長崎大学及びNIHE双方の倫理委員会より許可を得て共同研究者らと共に感染後回復ボランティアからの採血、患者分離H5N1ウイルス株収集を開始するに至っている。

我々はファージディスプレイ法により抗体の取得を目指してきたがライブラリー構築に数ヶ月から2年を要することもありその改善が必要であった。本申請であるリボソームディスプレイ法は最近開発された方法であり応用例は少ない。この方法はライブラリー構築及びスクリーニングを経て抗体単離に必要な期間を最短で3週間に短縮することができ、我々の迅速な抗体単離に応用可能な技術であるとともに技術確立の暁には様々なウイルスに対する中和抗体を世界

の医療現場に早期に送り出すことが可能になるものと思われる。

2. 研究の目的

本研究はこれまで既存の方法では数ヶ月から2年かかっていたモノクローナル抗体取得をリボソームディスプレイ法により最短3週間で可能にする事を主目的とするものである。その後H5N1インフルエンザウイルス中和能を有するヒト型モノクローナル抗体遺伝子をPCRランダム変異法を用いてその中和活性を10~100倍程度高めることにより様々なウイルス株（clade）を中和でき、医療の現場に投入できるレベルの抗体を作製すること。パンデミックウイルスの出現に備え様々なH5N1サブタイプに対する中和抗体を多種類単離することを可能にする技術の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

平成21年度

これまでのハイブリドーマ細胞によるスクリーニング及び抗体産生と比較し、ファージディスプレイ法を用いて抗原特異的な抗体scFv産生クローンをスクリーニングする方法は迅速かつ効率良く選別する事が可能となったものの大腸菌を用いた遺伝子組換え体作製の必要があり、そのライブラリーサイズは 1.0×10^8 程度が限界であった。近年開発されたリボソームディスプレイにおいては組換え体作製の必要が無くPCR産物を直接転写翻訳系にて反応させることにより抗原抗体結合スクリーニング操作に移行できるため時間の大幅な短縮が可能である。またそのライブラリーサイズも 1.0×10^{12} 程度とこれまでの1万倍も大きなサイズにすることが可能であり、ほぼ全ての抗体遺伝子を網羅することができる。リボソームディスプレイ法というのは無細胞発現系を応用した手法である。一般にリボソームは、タンパク質をコードするmRNA上を移動しながら翻訳を行い、終止コドンに出会うことで遊離し、翻訳は終了する。しかし、リボソームディスプレイ法では、mRNAの終止コドンを取り除くことでリボソームの遊離を抑制し、タンパク質（抗体）と遺伝子（mRNA）を結合させた状態の“タンパク質-リボソーム-mRNA”複合体分子を形成させる（図1）。scFv抗体ライブラリーを構築し、無細胞発現系を用いて複合体分子を作製し、標的分子に対して結合する分子をスクリーニングすれば、目的の抗体分子を特異的に選択することが可能となる。Plückthunらは大腸菌S30無細胞発現系を用いて抗原特異的なScFv抗体分子を単離することに成功した（Plückthun et al, Nature methods, p269-279, 2007）。大腸菌S30反応系は手軽に入手、実験できる反面、

RNaseの混入があるために実験中にRNAが分解してしまい精度の高い結果を得ることが難しかった。それで申請者は次世代の無細胞発現系であるPURESYSTEM (Protein Synthesis Using Recombinant Elements System)を用いる。PURESYSTEMは、東京大学の上野卓也教授グループにより開発された世界初の再構築無細胞タンパク質合成技術でリボソームタンパクなど構成する全てのタンパクが遺伝子組み換えタンパクであり、Hisタグカラムを用いて高度にアフィニティー精製されているためRNaseなどの混入がほとんど無く安定した高感度の結果を得ることが可能である。

マウスを用いた抗H5N1モノクローナル抗体は多数存在するが我々はヒト臨床サンプルを用いることにより人間に投与できる抗H5N1ヒト抗体の作製を行う。ベトナムにおいてインフルエンザウイルスH5N1感染し、その後回復したボランティアから血液の提供を受け、そのリンパ球よりTotal RNAを分離する。抗体の抗原結合領域(CDR)をはさむ部分に特異的なプライマーを作製、RT-PCR法でscFvに相当する部分を増幅し(図1)、その後PCR法を用いて5'側にT7プロモーターを導入する。3'側には安定化のためにストップコドンを除いたスペーサーを配してある。

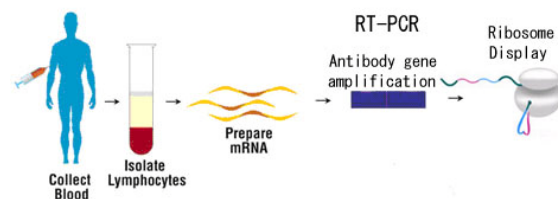


図1 リボソームディスプレイの流れ

PCR産物の両端にはステムループ構造をとるように配列が挿入されており、この構造がRNaseの結合を抑制しmRNAの分解を押さえるよう工夫している(図2a)。PCR産物をPURESYSTEM溶液に加えると転写と翻訳反応が同時に開始される。ストップコドンがないためリボソームはmRNAから分離せずに結合状態を維持する。“タンパク質-リボソーム-mRNA”複合体分子を用いてインフルエンザウイルスH5N1(患者分離株)を抗原にパニングと呼ばれるスクリーニング操作を行い、非特異的のscFv抗体を洗浄、除去する。抗原特異的に結合するリボソーム融合mRNAをEDTA溶液により溶出させRT-PCR法を用いて増幅させる。この操作を3~5回行うことによりアフィニティーの高いscFv抗体クローンを濃縮していく(図2b)。またこの手法がうまくいかない場合でもこのscFvラ

イブラリーはファージディスプレイ法とプライマーやスクリーニング手法に共通点があり容易に既存の方法に戻すことができる。その場合結果が出るまで3ヶ月ほど余計に時間がかかるものの安定した結果を得ることができる。ベトナム衛生疫学研究所のウイルス部長より協力および助言がありH5N1株の入手に関しては2005年以降の患者分離株を他種類準備可能である。

平成22年度

選抜されたFabクローンを大腸菌を用いて大量発現させHPLC精製装置を用いて精製する。精製Fabはインフルエンザウイルスへの結合能をELISA法によりスクリーニング後、MDCK細胞とH5N1ウイルスを用いた中和活性を調べる。より中和能の高いFabクローンはインフルエンザのどのタンパクと結合するのか、どのエピトープと結合するのかをヘマグルチニン(HA)、ノイラミニダーゼ(NA)組み換えタンパクを用いてELISA法で決定する。

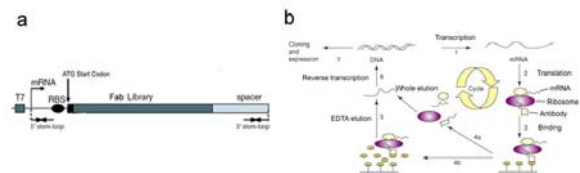


図2 a;リボソームディスプレイに用いるライブラリーの遺伝子構造
b;リボソームディスプレイによる抗体スクリーニングの流れ

またバッファー中のマグネシウム濃度を変化させることによりError-prone PCRを行い、その結果ランダム変異を導入し抗原に対してより高親和性の中和抗体に改良する。その後、高い中和活性を示すクローンは動物実験へ向けた基礎的知見を得るためにヒトIgG Fc領域と融合させヒト完全型抗体とする。発現はCHO-K1細胞を用いることにより糖鎖修飾されたIgGを発現させる。完全型IgGはProteinAカラムやイオン交換カラムにより精製後、H5N1ウイルス中和試験を行う。得られたデータはその後の動物を用いた感染防御能や人への臨床応用の基盤的データとする。

4. 研究成果

平成21年度においてH5N1感染回復患者由来のFab発現プラスミドライブラリーよりPCR法を用いてscFvライブラリーを作製した。その後T7プロモーター配列を有する長鎖ブ

ライマーを用いて再度増幅し、5'側に T7 配列を配した。この scFv を Puresystem 無細胞発現システムを用いて in vitro 転写・翻訳を行った。翻訳された scFv タンパクはリボソームタンパクを介して mRNA と結合状態にある。転写された mRNA および翻訳された scFv タンパクはアガロース電気泳動およびウエスタンブロットによって確認した。パンニング抗原には H5N1 インフルエンザウイルス (A/Vietnam/31244/07) のリコンビナント HA タンパクを用いた。ELISA ウェルに固層化したリコンビナント HA タンパクに対して 3 回パンニングを行い、RT-PCR によって増幅した scFv 遺伝子を制限酵素 NcoI および NotI にて切断し、大腸菌発現ベクター pIT2 にライゲーションした。その後大腸菌 HB2151 株へ形質転換した。得られたコロニーをピックアップし 96 穴ディープウェルを用いて培養し、scFv タンパクを発現させ、発現量および HA タンパクへの結合能を ELISA 法により確かめた。約 1200 個のサンプルから 30 個の scFv 発現クローンを得た。その内 12 個が HA タンパク結合能を有した。結合するかどうかの判定は ELISA での吸光度値 (490nm) が 0.5 以上とした (図 3)。

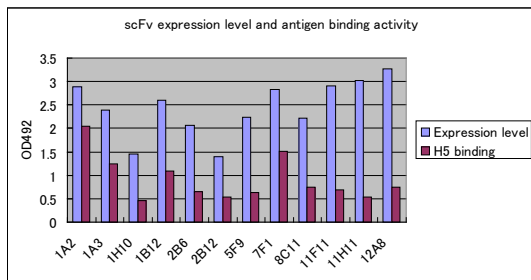


図 3 選抜された 12 クローンの scFv 発現量と H5N1 組換えヘマグルチニンタンパクへの結合能

選抜された 12 クローンの大腸菌は 2L の培地にて大量培養し TALON メタルアフィニティークラムにて精製した。精製された scFv タンパクは Amicon Ultra 限界濾過カラムを用いてさらに濃縮した。精製 scFv タンパクは SDS-PAGE を用いて精製度を確認し、Protein L HRP (1:2000 倍希釈) タンパクを用いたウエスタンブロットによって発現を確認した (図 4)。精製 scFv タンパクは H5N1 HA タンパクに対して結合能を有しているが赤血球凝集阻害活性 (Hemagglutinin inhibition, HI) は示さなかった。これは scFv 抗体が HA タンパクのシアル酸認識部位以外の所に結合しているか scFv 抗体の分子量が小さいために HI 活性を発揮できなかったためではないかと推察される。scFv 抗体を IgG 型に変換すると HI 活性を発揮する可能性もあるがその実験までは達していない。

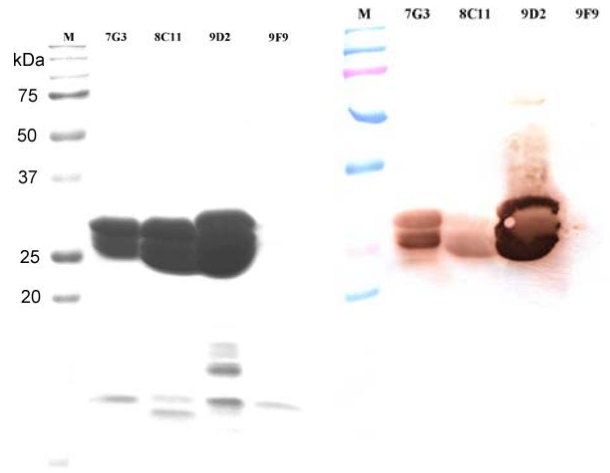


図 4 精製した scFv の発現量解析およびウエスタンブロット。左図、SDS-PAGE 後 CBB 染色。右図、Protein L HRP (1:2000) によるウエスタンブロット

A/Vietnam/31244/07 株を用いた中和試験の結果、1 つのクローンが $62 \mu\text{g/ml}$ (2.5nM) の濃度でウイルスの MDCK 細胞への感染を 50% 阻害した (図 5)。

またこの scFv タンパクを抗 His 抗体と反応させ擬似的に IgG フォーマットにして中和活性を行ったが scFv 単独の場合と大きな活性の変化は見られなかった。現在このクローンが認識するターゲットタンパクとそのエピトープを探索中である。また同時に scFv フォーマットから IgG フォーマットへ変換し中和活性の向上を図っている。その後 H5N1 のクレードの違いによる中和活性の変化や H1, H3 インフルエンザウイルスとのクロス中和反応を試験する予定である。

scFv	Titer	50% Neutralizing (nM)
1A2	<1:2	>20
1A3	1:4	10
1H10	<1:2	>20
1B12	1:4	10
2B6	<1:2	>20
1B12	1:4	10
5F9	1:4	10
7F1	1:4	10
8C11	1:16	2.5
11F11	<1:2	>20
11H11	1:4	10
12A8	<1:2	>20

図 5 単離した scFv 抗体の中和活性

H5N1 ウイルスは A/Vietnam/31244/07 株を使用。scFv 8C11 が 1:16 倍希釈 (2.5nM) の濃度でウイルス感染を 50% 阻害した

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)

[学会発表] (計2件)

- ① Construction of a human Fab library and molecular cloning of human monoclonal Fab with neutralizing potencies against Influenza A subtype H5N1 strains, Gen-ichiro Uechi; Le Q. Mai; Etsuro Ono; Tetsu Yamashiro. アジア・アフリカリサーチフォーラム ハノイ 2010年11月11-12日
- ② 高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対して中和活性を有するヒト単クローン性 Fab 抗体の単離に関する研究、上地 玄一郎、Le Q. Mai、小野 悦郎、山城 哲 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月7-9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上地 玄一郎 (UECHI GENICHIRO)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：10420647