

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20780

研究課題名（和文）ウイルス感染症治療薬としての低分子抗体作製技術の基盤構築

研究課題名（英文）Establishment of antiviral small molecule antibody technology

研究代表者

赤澤 大輔（AKAZAWA, Daisuke）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・主任研究官

研究者番号：50953527

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：既存の抗体医薬の弱点を克服しうる新規モダリティとして低分子抗体に着目し、ウイルス・宿主タンパク質間相互作用を標的としたシングルドメイン抗体の多様性クローンの作製・スクリーニング法を検討した。

(1) 肝炎ウイルス受容体の組換えタンパク質をアルパカに免疫し、抗原特異的な抗体誘導を確認した。また、抗原結合性VHH発現アルパカB細胞の分離法を確立し、VHH抗体配列の同定後、組換えモノクローナルVHH抗体を作製・評価してモノクローナル抗体を取得した。

(2) VHH抗体ライブラリーを用いてウイルス抗原に対するVHH抗体をスクリーニングし、高親和性の多価抗体および二重特異的抗体の作製が可能であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は標的特異性および親和性が高く副作用も少ないモダリティであるが、高分子であるため、立体障害により機能性部位にアクセスできない場合があること、製造に多大なコストがかかるなどの課題がある。本研究成果は、これらの課題を解決すべく、低分子抗体に着目して研究を進めてきた。本研究成果は、既存抗体では得られにくい多様性エピトープを有する抗体作製手法や抗体改変技術を含み、新規抗ウイルス薬モダリティの発展に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Focusing on small molecular antibodies as a new modality that can overcome the weaknesses of existing antibody drugs, we investigated methods for producing and screening diverse clones of single domain antibodies targeting virus-host protein interactions.

(1) We immunized alpacas with recombinant hepatitis virus receptor proteins and confirmed the induction of antigen-specific antibodies. We also established a method for isolating alpaca B cells expressing antigen-binding VHH, and after identifying the VHH antibody sequence, we produced and evaluated recombinant monoclonal VHH antibodies to obtain monoclonal antibodies.

(2) Using a VHH antibody library, we screened VHH antibodies against viral antigens and found that it is possible to generate high-affinity multivalent and bispecific antibodies.

研究分野：ウイルス学、生物工学

キーワード：シングルドメイン抗体 抗ウイルス

1. 研究開始当初の背景

これまで、ウイルス由来の酵素などを標的とした低分子抗ウイルス薬の研究開発が進められ、実用化されてきた。ウイルスは適応変異等で様々な治療から逃れるため、複数の手段をもって対処する必要がある。例えば、受容体との相互作用やタンパク質間相互作用 (PPI) の阻害なども治療標的として期待できる。しかし、低分子化合物は PPI 阻害には不向きであり、ペプチドや抗体、アプタマーなどがモダリティ候補に挙げられる。中でも抗体は、標的分子に特異的かつ高親和性に結合する特長から、副作用が少なく高い薬効が期待できる。しかしながらその分子の大きさから、標的分子の立体構造によっては抗原へのアクセスが困難で機能しない場合があること、細胞内の分子は標的とできないなどの制約があり、また注射投与に限られることと製造コストの高さが開発の大きな壁となっている。「低分子抗体」が開発できれば、上記抗体医薬の弱点の多くを克服し、ウイルス感染症制御への新たなアプローチが可能になると期待される。

近年、ラクダ科は他の動物にはない重鎖一本鎖抗体を保有すること、その可変領域ドメイン (VHH, 図 1B) は通常の抗体の約 10 分の 1 の分子量でフルボディと同等の抗原親和性を示すこと、さらには、フルボディにはない下記の特長を有することがわかっている。

- ① 平面・凹部・凸部などの様々なタンパク質立体構造を認識可能
- ② 大腸菌や酵母などで作製可能 (生産性・コスト面での優位性)
- ③ 温度、pH に対する高い安定性
- ④ 細胞内で機能し、細胞内分子を標的可能
- ⑤ 高機能付加抗体 (多価、二重特異性、エフェクター機能) の作製が容易

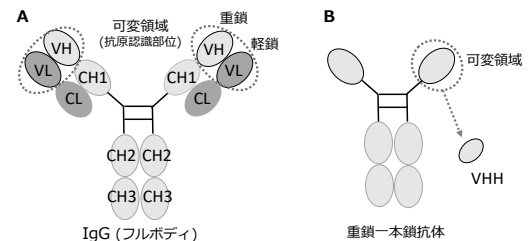


図1 低分子抗体の構造

このように VHH は、抗体医薬の利点を保持しつつも、その弱点をさらに克服でき得る PPI 阻害抗ウイルスモダリティ候補である。

2. 研究の目的

本研究では、抗ウイルス薬候補としての低分子抗体開発の基盤技術構築を目指し、アルパカに抗原免疫し、多様性を獲得した高活性モノクローナル VHH を取得する。まずは、B 型肝炎ウイルス (HBV) 受容体である膜トランスポーター NTCP を標的として HBV 侵入阻害抗体を取得し技術確立することを目的とした。

VHH 抗体の特色を活かした技術開発として、VHH 改変抗体の検討も行った。重点感染症の一つであるエムボックスウイルス (MPXV: 旧名サル痘ウイルス) の世界的なアウトブレイクが発生し、その MPXV の感染には複数のウイルス抗原の関与が示唆されている。そこで、MPXV の複数のウイルス抗原に対する VHH 抗体を作製し、それらを連結させた多価抗体の検討を進めることで、VHH 改変抗体のポテンシャル検証を行った。

本研究を通じてエピトープ多様性の VHH スクリーニング技術・改変抗体作製技術が構築されれば、本技術は理論的にはウイルス種を選ばず適応可能である。また現在 undruggable な標的と考えられている分子も標的にできることから、大きな波及性と創造性をもつ研究となり得る。

3. 研究の方法

モノクローナル VHH 抗体作製技術の構築 (ウイルス受容体に対する抗体をモデルとした検討)

(1) NTCPタンパク質をアルパカに2週毎に5回免疫後、初回免疫から5, 7および9週後に採血して血清分離し、NTCPタンパク質固相化プレートを用いたELISAにより抗体価の上昇を確認した。Protein AおよびProtein Gカラムを用いて、免疫後血清からアルパカIgG1

(conventional IgG: VHHを含まない)、IgG2およびIgG3 (heavy-chain IgG: VHHを含む) を精製した。これらの精製IgGを、血清と同様にNTCPに対するELISAで結合性を検証した。免疫後血清および精製IgGは、NTCP発現細胞に対するpreS1結合評価系を用いて阻害活性を調べた。また、精製IgG2およびIgG3をパパイインで処理し、ポリクローナルVHHの調製を行った。

- (2) 抗ラマpan-T抗体、抗ラマpan-B抗体、抗ウシCD14抗体、抗アルパカVHH抗体の各々の蛍光ラベル抗体を調製し、免疫前アルパカの末梢血から分離したPBMCをフローサイトメトリー解析して、VHH発現アルパカB細胞を分離する手法を構築した。
- (3) フローサイトメトリーのプローブとしてEGFP融合NTCPタンパク質を作製した。このプローブを用いて、免疫9週後のアルパカPBMCを上記2の方法で分離し、NTCP結合性のVHH発現アルパカB細胞をソーティングした。
- (4) VHH抗体配列の同定は次の2つの方法にて行った。
 - A.ソーティングした B 細胞から合成した cDNA をテンプレートに、VHH 特異的プライマーを用いて PCR を行い、PCR product を大腸菌発現ベクターpET-22b(+)に in-frame で挿入してライブラリーを作製した。形質転換した大腸菌のシングルコロニーからプラスミドを抽出して、挿入された VHH 遺伝子配列を同定した。
 - B.A と同一の cDNA をテンプレートに、アダプターを連結した VHH 特異的プライマーを用いて PCR を行い、アンプリコンシークエンス解析 (MiSeq) による網羅的解析によって VHH 遺伝子配列を同定した。
- (5) 上記 4 の A および B で共通する VHH 遺伝子をピックアップし、VHH 抗体を大腸菌で発現・精製した。精製 VHH 抗体は、NTCP タンパク質固相化プレートを用いた ELISA により結合性を評価した。

VHH をベースとした高機能抗体作製技術の構築 (抗ウイルスタンパクをモデルとした検討)

- (1) ヒト化VHH抗体発現ファージライブラリーを用いて、MPXVの表面抗原2種に結合するファージを選択し、配列同定後、大腸菌にてVHH抗体を発現・精製してELISAによる抗原特異的モノクローナルVHH抗体を決定した。
- (2) (2)で得られたVHH単量体に加え、それらのホモ／ヘテロ2量体を作製し、表面プラズモン共鳴法によって抗原親和性を評価した。

4. 研究成果

モノクローナル VHH 抗体作製技術の構築 (ウイルス受容体に対する抗体をモデルとした検討)

アルパカに NTCP タンパク質を 2 週毎に 5 回免疫を行った (0, 2, 4, 6, 8w)。採血はプレ血清として免疫 1 週前に、免疫後は 5, 7 および 9w に行った。アルパカの血清を用いて NTCP 結合 ELISA を行い、免疫によって抗 NTCP が誘導されていることを確認した (図 2)。血清から精製した IgG1、IgG2 および IgG3 を同様に ELISA で評価し、VHH を構成する IgG2 および IgG3 において NTCP への結合性が確認された (図 3)。また、免疫後血清、および、精製 IgG2/3 に NTCP と preS1 (HBV の NTCP 認識部位ペプチド) の結合阻害活性が認められた (図 4 および図 5)。したがって、免疫されたアルパカに HBV の感染を中和しうる抗 NTCP VHH 抗体が誘導されていることが示唆された。

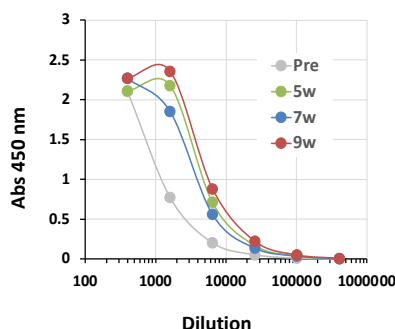


図 2. 抗原免疫アルパカ血清中の特異的抗体の検出

アルパカに抗原タンパク質を 2 週毎に 5 回免疫し、初回免疫から 5, 7 および 9 週後の血清を分離して、段階希釈した血清について NTCP 固相化プレートで ELISA を行った。免疫前血清 (Pre) は免疫 1 週前の血清を用いた。

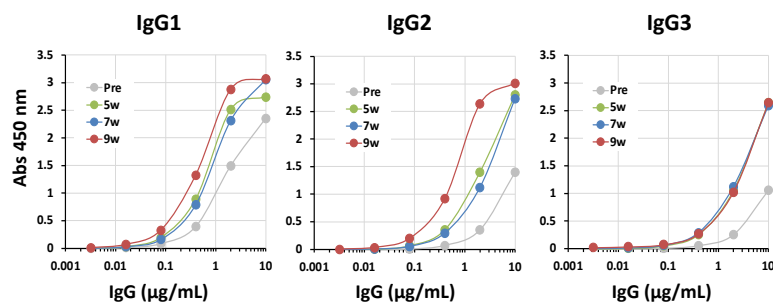


図 3. アルパカ血清からの精製 IgG を用いた特異的抗体の検出

アルパカ血清から Protein A および G カラムを用いて IgG1、IgG2 および IgG3 を精製し、図 2 と同様に NTCP 固相化プレートで ELISA を行った。

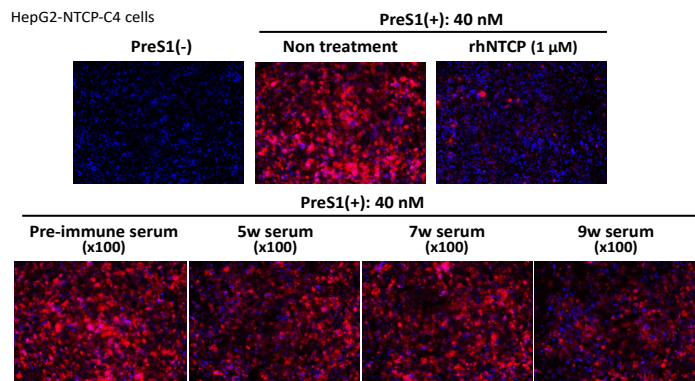


図4. アルパカ血清による NTCP-preS1 ペプチドの結合阻害評価

アルパカ血清 (Pre および免疫後 5, 7, 9 週) を蛍光標識 preS1 ペプチドと混合し、NTCP 発現細胞に添加して結合した preS1 を蛍光顕微鏡で検出した (青: 核、赤: preS1)。コントロールには、リコンビナント NTCP タンパク質を用いた。

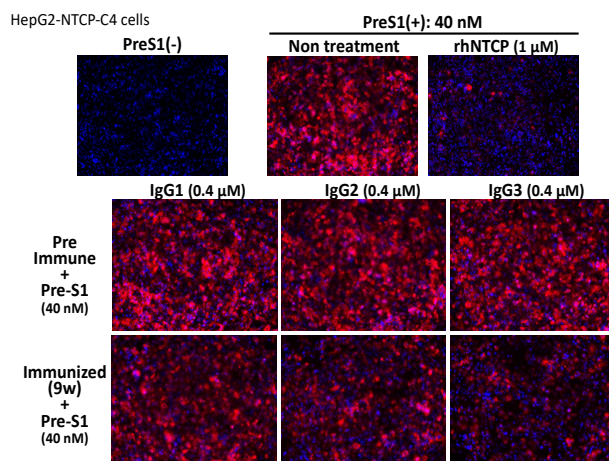


図5. アルパカ血清由来 IgG による NTCP-preS1 ペプチドの結合阻害評価

アルパカ血清 (Pre および免疫後 9 週) から精製した IgG を用いて、図3と同様に NTCP-preS1 結合阻害を評価した。

次に、免疫後 9w のアルパカ PBMC から NTCP 結合性 VHH を発現する B 細胞をフローサイトメトリーで分離してソーティング後 (図6)、cDNA を合成し、VHH 特異的プライマーを用いた PCR で VHH 遺伝子 (IgG2 または IgG3 由来) を増幅した。PCR product を大腸菌発現ベクター pET-22b(+) に in-frame で挿入して、大腸菌形質転換の後、シングルコロニーをピックアップしてプラスミド抽出し、VHH 遺伝子配列を同定した。また、同一の cDNA をテンプレートに MiSeq アンプリコンシーケンスによって網羅的に VHH 遺伝子配列を同定した。2つの方法で同定した VHH 遺伝子配列において共通する VHH について、先行して検討することとし、大腸菌 BL21(DE3) に発現させて精製 VHH 抗体を得た (24 クローン)。取得した VHH 抗体の NTCP 結合性を ELISA で調べたところ、ほとんどのクローンで NTCP に結合することが示され (図7)、新規 VHH 抗体取得法が確立できた。これにより、機能性 VHH 抗体を、多様性をもって作製・スクリーニングする一つの方法が提供できるものと考ええる。

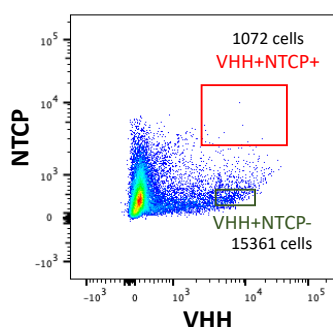


図6. 抗原免疫アルパカ PBMC からの NTCP 結合性 VHH 発現 B 細胞の分離

抗原の初回免疫から 9 週後のアルパカ血液から PBMC を分離し、NTCP プローブに結合する panB⁺panT⁺VHH⁺細胞をソーティングした。

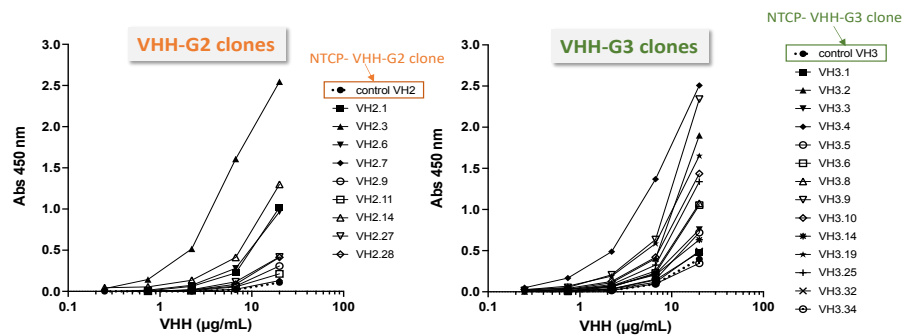


図 7. モノクローナル VHH 抗体クローンの NTCP 結合性評価

抗原免疫アルパカ B 細胞から分離、同定した VHH 抗体を大腸菌で発現・精製し、NTCP 固相化プレートを用いて ELISA を行った。VHH 抗体クローンは、IgG2 および IgG3 由来で各々単離した。コントロールクローンは、フローサイトメトリーにて NTCP 非結合性 VHH⁺ B 細胞由来のクローンをを用いた。

VHH をベースとした高機能抗体作製技術の構築 (抗ウイルスタンパクをモデルとした検討)

MPXV の表面抗原である H3L および M1R に対する VHH 抗体を、ヒト化 VHH 抗体ライブラリーを用いてスクリーニングし、精製抗体を作製した。また、2 分子の抗体を GGGGS のペプチドリンカーで連結したホモおよびヘテロ二量体をコードする VHH 遺伝子を作製し、大腸菌に発現させて精製 VHH 抗体を得た。これらの抗体について、表面プラズモン共鳴法で抗原親和性を評価したところ、ホモ二量体の親和性は単量体の約 100 倍に向上することがわかった (図 8)。また、H3L と M1R の各々に対する VHH 抗体のヘテロ二量体について、適切な連結方法によって 2 種の分子を同時に認識可能な bispecific 抗体を作製することが可能となった (図 9)。これらの成果は、VHH 抗体の高機能化に向けた改変戦略の立案に有用である。

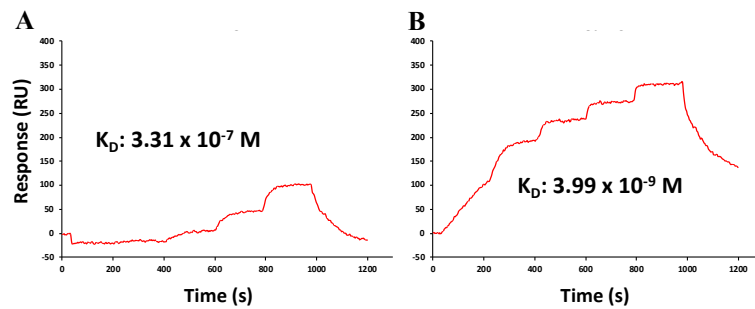


図 8. 抗 MPXV-M1R VHH 抗体の抗原親和性

MPXV の M1R に対する VHH モノクローナル抗体の単量体 (A) およびホモ二量体 (B) について、M1R 抗原をリガンドとして表面プラズモン共鳴法で解離定数 (K_D) を測定した。解析はシングルサイクルキネティクス法で行った。

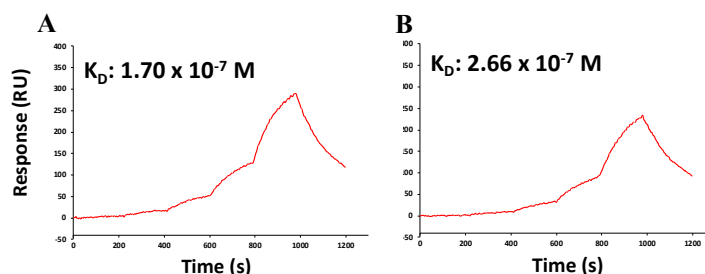


図 9. 抗 MPXV-M1R/H3L bispecific VHH 抗体の抗原親和性

MPXV の抗 M1R および抗 H3L VHH 抗体をペプチドリンカーで連結したヘテロ二量体について、(A) M1R リガンドおよび (B) H3L リガンドに対する親和性を表面プラズモン共鳴法で解析した。解析はシングルサイクルキネティクス法で行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morino E, Mine S, Tomita N, Uemura Y, Shimizu Y, Saito S, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Mpox Neutralizing Antibody Response to LC16m8 Vaccine in Healthy Adults	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 NEJM Evidence	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1056/EVIDoa2300290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hishiki T, Morita T, Akazawa D, Ohashi H, Park ES, Kataoka M, Mifune J, Shionoya K, Tsuchimoto K, Ojima S, Azam AH, Nakajima S, Kawahara M, Yoshikawa T, Shimojima M, Kiga K, Maeda K, Suzuki T, Ebihara H, Takahashi Y, Watashi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of IMP Dehydrogenase as a Potential Target for Anti-Mpox Virus Agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00566-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akazawa D, Ohashi H, Hishiki T, Morita T, Iwanami S, Kim KS, Jeong YD, Park ES, Kataoka M, Shionoya K, Mifune J, Tsuchimoto K, Ojima S, Azam AH, Nakajima S, Park H, Yoshikawa T, Shimojima M, Kiga K, Iwami S, Maeda K, Suzuki T, Ebihara H, Takahashi Y, Watashi K	4. 巻 228
2. 論文標題 Potential Anti-Mpox Virus Activity of Atovaquone, Mefloquine, and Molnupiravir, and Their Potential Use as Treatments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 591 ~ 603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/infdis/jiad058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤澤大輔, 下島昌幸, 朴ウンシル, 前田健, 海老原秀喜, 高橋宜聖, 渡士幸一	
2. 発表標題 エムボックスウイルス感染中和抗体の標的ウイルス抗原解析	
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会	
4. 発表年 2023年	

1．発表者名 岩波翔也，山本将太郎，日紫喜隆行，赤澤大輔，大橋啓史，森田武志，渡士幸一，岩見真吾
2．発表標題 数理モデルを用いた抗サル痘ウイルス薬候補の定量的評価
3．学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4．発表年 2023年

1．発表者名 日紫喜隆行，森田武志，赤澤大輔，大橋啓史，朴ウンシル，片岡紀代，御船淳紀，塩野谷果歩，土本佳奈，小島新二郎，アザム アア，中嶋章悟，河原円香，吉河智城，下島昌幸，氣鷲恒太郎，前田健，鈴木忠樹，海老原秀喜，高橋宜聖，渡士幸一
2．発表標題 エムボックスウイルス複製に関与するイノシンーリン酸デヒドロゲナーゼの同定と創薬標的としての可能性
3．学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------