

令和元年5月9日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18173

研究課題名(和文)抗体医薬品開発を目指した流入下水由来抗体遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of antibody genes existing in influent sewage for antibody pharmaceuticals development.

研究代表者

稲葉 愛美 (Inaba, Manami)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・客員共同研究員

研究者番号：60749448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：感染症治療に有効であると期待される抗体医薬品の開発のために、下水流入水に存在する抗体遺伝子の網羅的解析を試みた。下水流入水に添加した樹立B細胞のVDJ領域を対象に既存PCR法での検出では、非特異的な産物の合成が複数確認された。そこで、遺伝子データベース上に報告されているヒトB細胞のVDJ領域を網羅的に収集し、プライマー設計のための解析を行った。また、網羅的な遺伝子情報を収集するために、対象領域の下流部はB細胞遺伝子の定常領域に設定した。網羅性を高めるために、VDJ領域の上流側に存在する比較的保存性の高い領域を対象に5つのプライマーを設計した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用な抗体遺伝子情報が存在すると考えられる流入下水に着目した網羅的解析は、情報収集の制限を解消するものである。本研究で開発したヒトB細胞のVDJ領域を対象にした高感度PCR法のプライマーは、流入下水中からの抗体遺伝子情報の収集の可能性を示すものである。流入下水中に存在するには、未知の感染症に対する抗体遺伝子情報も存在すると考えられ、将来的な抗体医薬品の開発における貴重な遺伝子情報ライブラリーになりえる。

研究成果の概要(英文)：In order to develop antibody pharmaceuticals which are expected to be effective for infectious diseases treatment, comprehensive analysis of antibody genes existing in influent sewage was attempted. Synthesis of multiple nonspecific products were confirmed from established B cell strain added to influent sewage by existing PCR method targeting for VDJ region. The genomic information of VDJ region in human B cell were collected comprehensively, and analyzed for designing the sensitive primer. Downstream primer was targeting at conservative region of B cell gene for collecting the genomic information comprehensively. Upstream primers were designed to target the highly sensitive site at upstream side of VDJ region.

研究分野：環境ウイルス学

キーワード：抗体医薬品 流入下水 抗体遺伝子

1. 研究開始当初の背景

下水処理場の流入下水には、集水域居住者に顕性・不顕性感染したさまざまな病原体が糞便と共に排出され、高濃度で存在している。下水中の病原体には胃腸炎症状を引き起こすものが多いが、それらは腸管粘膜組織に感染し増殖・複製する一方で、宿主の腸管免疫システムによる排除の圧力を受ける。腸管免疫システムで重要な役割を担っている B 細胞は、他の免疫細胞と同様に骨髄中の造血幹細胞が分化したもので、抗体である免疫グロブリン（immunoglobulin: Ig）を提示・産生する形質細胞、もしくは記憶細胞になる。ヒトの免疫細胞はパイエル板に代表される腸管関連リンパ組織内に 60~70%が存在し、そこで B 細胞は IgA を産生する。腸管上皮の細胞・組織は新陳代謝が早く、約 24 時間で入れ替わり（脱離）糞便中に混入する（THE CELL 4ed）。ゆえに、糞便が集積する下水には、さまざまな病原体に対する免疫細胞、即ち、抗体遺伝子が存在していると考えられる。下水中に存在すると考えられる抗体遺伝子は、感染症治療のための医薬品開発において利用価値の高い重要な情報である。近年、さまざまな感染症に対して抗体を医薬品として治療に用いる試みが活発に進められている。抗体を利用した医薬品（抗体医薬品）は、非常に高い特異性、生体内での高い安定性、低毒性など、薬効が高く副作用が生じにくいなどの利点を有する。また、抗体は複雑な修飾作業を必要とせず、共通性の高い手法での生産が可能であり、低コストで安定生産が可能な非常に利用価値の高い医薬品になると考えられている。しかし、販売・開発中の抗体医薬品は、患者検体（病巣部・血液）から直接採取された B 細胞や抗体に由来したものであり、且つほとんどが癌とその関連疾患に対するものである（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 <http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/mab-t1-190501.pdf>）。それに対し、感染症に対する抗体医薬品の開発・研究は相対的に遅れている。感染症の免疫持続期間は病原体により異なり、短いものは数ヶ月で消失してしまうこと、また病原体の遺伝的多様性のために特定の抗体が効力を発揮する株が限定されてしまうこと、などがその理由である。感染症病原体に対する抗体の探索は、時間的制限のなかで多種多様な抗体遺伝子情報を網羅的に収集することが求められる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト体内で産生された抗体の遺伝子情報を網羅的に収集するために下水に着目した。複数のヒトから排出された糞便が集積する下水には、集水域居住者の体内で生じた抗原抗体反応の種類を反映した B 細胞が多様性を保持して存在していることが予想される。ゆえに、下水中からはさまざまな病原体（ノロウイルス、A 型肝炎ウイルス、サルモネラ菌など）に有効な抗体情報が得られる可能性が高い。また、B 細胞で産生される膨大な抗体情報や未知の病原体に対する抗体情報も得られ、将来的な抗体医薬品開発に有益な遺伝子ライブラリーとしての情報蓄積において重要な意味を成すと考えられる。しかしながら、下水中の B 細胞の存在や多様性について調べられた研究はこれまで皆無であり、本研究は抗体医薬品開発の情報収集で

革新をもたらすと期待される。そこで、本研究では、下水のモニタリングによる B 細胞の検出・同定を行い、抗体遺伝子の網羅的解析及び情報蓄積を試みた。

3. 研究の方法

まず、下水流入水中からの B 細胞の効率的な濃縮回収方法の確立を試みた。下水中の B 細胞は、腸管細胞・組織内に保存された状態、もしくは下水中の有機物に吸着した状態で存在すると考えられたため、超音波破碎→遠心分離、または PEG 沈殿→密度勾配遠心分離→B 細胞の膜表面に発現するの機能分子 (Cluster of Differentiation; CD) を抗体でラベルした磁気ビーズ処理、の操作により阻害物質を含んだ不純物の除去を行い、B 細胞のみの分離・精製が可能か検討した。一方で、抗体遺伝子の情報を網羅的に回収し、解析するためには、抗体結合部位の遺伝子情報をコードする VDJ 領域を高感度で検出する PCR 法の開発が重要である。そこで、遺伝子データベース上に報告されている B 細胞の遺伝子情報を網羅的に解析し、VDJ 領域を対象としたプライマーの設計を行った。

4. 研究成果

流入下水中の抗体遺伝子の回収・検出法の検討として、樹立株化 B 細胞 (15310-LN) を用い、採取した下水流入水に株化 B 細胞を添加し、B 細胞表面に発現している機能分子が検出可能か検討したところ、添加 B 細胞は浸透圧の変化により添加後著しく急速に形状が変化することが確認された。また、添加 B 細胞の機能分子、CD19、20、40 が検出可能であるか、蛍光抗体法を用いた顕微鏡観察を行ったところ、B 細胞の機能分子に特異的な蛍光は確認されなかった。このことから、下水中に有機物質に吸着するなどの状態で存在する B 細胞に対して、B 細胞の抗体遺伝子の回収方法とした機能分子を対象とした特異的な回収方法は適切ではないことが確認された。また、腸管細胞、腸管組織に保存された状態で存在する B 細胞に対しても、破碎回収の段階で、同様の変性が生じる可能性が高いことから適切手法ではないことが示唆された。一方で、B 細胞添加流入下水試料を PEG 沈殿法により濃縮した試料から抽出した核酸に対し、既報の PCR 法 (Wang & Stollar (2000) JIM. 244. 17-225.) による VDJ 領域の検出を行ったところ添加後 24 時間の試料からも特異的な産物の合成が確認された。しかし、非特異的な産物の合成も複数確認され、PCR 法の検出感度を向上させる必要があると考えられた。そこで、現在、遺伝子データベース上に報告されている B 細胞の VDJ 領域の情報を網羅的に解析し、VDJ 領域において比較的保存性の高い部位において 5 つのプライマーの設計を行った。また、VDJ 領域全体の遺伝子情報を回収するために、下流部は B 細胞遺伝子の定常領域を対象とした既存プライマーを用いた (Kitaura et al. (2017) FII. 8(389). 1-1)。その結果、下水流入水に添加した B 細胞試料から、高感度で特異的な産物が検出された。しかし、数は少なくなったものの非特異的な産物の合成も確認された。このことから、設計したプライマーにより、下水からの抗体遺伝子の検出できる可能性が得られた。しかし、この結果は、下水に対する添加した B 細胞を対象にした結果であり、実際の下水からの検出には、対象下水試料の容量を増加させるなど

の検討が必要だと考えられる。

本研究は、下水試料に含まれる抗体遺伝子情報の活用の重要性を提案した研究であり、感染症の治療に有用な抗体遺伝子を網羅的回収できる可能性を示した試験的なものである。下水中の抗体遺伝子の情報は、未知なものを含め豊富に存在すると考えられ、将来的な抗体医薬品開発における貴重な遺伝子情報ライブラリーとなりうる可能性を秘めていると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当者なし

(2) 研究協力者

該当者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。