

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08333

研究課題名（和文）EPCRに結合するモノクローナル抗体による重症性マラリア治療法の開発

研究課題名（英文）Development of humanized anti-EPCR mAb

研究代表者

福留 健司（Fukudome, Kenji）

佐賀大学・全学教育機構・教授

研究者番号：50284625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：重症マラリアの感染を阻止するが、血液凝固制御機能に必須であるEPCRの機能には影響しないラットモノクローナル抗体を樹立した。この抗体の可変部領域の遺伝子配列を決定して、ヒトの定常部領域とのキメラ抗体を産生するプラスミドを構築した。これをヒト由来293細胞にトランスフェクトして、安定的にキメラ抗体を産生する細胞株を樹立した。これを無血清培養に馴化し、大量培養を行った。上清より高純度のキメラ抗体の精製が可能になったので、医薬品への応用を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在行われている低分子化合物による治療法には、薬剤抵抗変異の共通問題がある。抗体を利用した新たな治療法の選択肢ができることで、現状を海瀬できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We generated an anti-human EPCR monoclonal antibody from rat spleen. It prevents infection of severe malaria without affecting to anti-coagulation functions of EPCR. We determined the gene sequence of variable region of this antibody. We constructed a plasmid which produces of chimeric antibody with human conserved region. By transfection and selection, we established a HEK293 cell line which stably produces the antibody. Highly purified antibody was able to be obtained from the supernatants of serum-free culture. We are characterizing this material to apply clinical use to malaria infection.

研究分野：血栓症

キーワード：プロテインC 受容体、モノクローナル抗体 重症マラリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは最大の感染症で、当時の罹患者は年間 3-5 億人で死者は 150-270 万人とされていた。世界保健機構が設立された時の目標として「マラリアと天然痘の根絶」が提唱されたが、1980 年に根絶された天然痘とは異なり、マラリア根絶のめどは全く立っていない。マラリアの治療薬としては長年、クロロキンやキニーネ等の選択制の低い薬剤が使用されていたが、副作用と耐性虫の拡大の問題であった。この問題を改善するアルテミシニンの発見により、2015 年にトウ・ヨウヨウ氏がノーベル医学生理学賞を受賞したが、早くも耐性虫が出現しているため更なる治療薬の開発が求められていた。マラリアは、ハマダラ蚊に寄生して吸血行動を利用することで、人間の体表のバリアーを簡単に乗り越えて、血中に侵入してくる。また、ヒト以外の哺乳類にも感染するので根絶は非常に難しい。また、マラリアを媒介するハマダラ蚊は、本来熱帯地方に限定して生息してきたが、地球温暖化と国際化の結果として日本を含むより広い生息域を持つことが懸念されていた。

マラリアはいくつも種類があるが、その中でも特に致死率が高い重症性マラリアが知られている。年間、約 800 万人が感染しており、マラリアによる死者の多くが、重症性マラリアによるものである。重症性マラリア感染による病変では、深部静脈血栓症を伴うことが特徴的である。重症性ではない一般的なマラリアに関しては、哺乳類への感染時にスカベンジャー受容体である CD36 を利用されていることが知られていたが、重症性マラリアに関しては、CD36 ではなく、我々が発見した EPCR を標的としていることが明らかになった(Turner L. et al, 2013, Nature, 498; 502-504)。EPCR は動脈や静脈の血管に発現している分子であり、抗凝固因子であるプロテイン C の活性化を生理的条件下で可能にしている分子である。EPCR にはこの他にも血液凝固第 VII 因子との結合活性や、ストレス下での血管内皮のアポトーシスの回避を媒介する機能が知られている。したがって、EPCR の機能は血栓症や血管損傷の回避に必要な分子である。重症性マラリアは、EPCR のこれらの機能を障害してしまい、結果的に感染者は血栓症で死亡する。

EPCR の発見後は、我々はこの分子に対するモノクローナル抗体の作成を主眼に置いてきた。開発した抗体を世界中の研究者に提供することで、この分子の機能が明らかになってきた。EPCR の様々なエピトープを認識する 400 以上の抗体を作成したが、この中に、マラリア感染を阻止する抗体があると考えた。そこで、Dr. Mosnier L.O. (Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Institution, U.S.A.) のグループと共同研究を行い、EPCR の抗凝固活性には影響を当てないが、マラリアの結合を阻止できるモノクローナル抗体を特定した。抗体の投与により、EPCR の機能を保護して、マラリアの侵入を防ぐことができると考えた。そこで、この抗体を

産生するハイブリドーマから可変部領域をコードする遺伝子領域をクローニングして配列の決定を行った。

2．研究の目的

モノクローナル抗体を利用した重症マラリアの新たな治療法開発を試みる。

3．研究の方法

我々が作成したモノクローナル抗体は免疫したラットの B 細胞から作成したものであるため直接に医薬品等に応用することはできない。そこで、決定した遺伝子情報をもとに定常部領域をヒトの配列に置換したキメラ抗体を作成して重症マラリアの治療法の開発を行う。

4．研究成果

ヒト化抗体を産生するプラスミドの構築を行った。このプラスミドをヒト腎由来 HEK 293 細胞にトランスフェクションした後に、G418 セレクションによって安定的にキメラ抗体を産生するクローンを得ることができた。この細胞株を、無血清培地に馴化させて、大量培養を行った。イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過により、純度の高い精製抗体が十分精製される方法を確認した。この抗体の医薬品への応用を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 N. Hayashi, Y. Shoubayashi, N. Kondo, K. Fukudome	4. 巻 511
2. 論文標題 Hydrothermal processing of beta-Glucan from Aureobasidium pullulans produces a low molecular weight reagent that regulates inflammatory responses induced by TLR ligands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 318-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.042	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 Niamh O'Regan 1, Kristina Gegenbauer 1, Eimear M Gleeson 2, Kenji Fukudome 3, Jamie M O'Sullivan 4, Clive Drakeford 1, Niall Dalton 1, Alain Chion 4, Teresa M Brophy 1, Owen P Smith 5, Roger J S Preston 6, James S O'Donnell 7	4. 巻 107
2. 論文標題 Hemostatic and protein C pathway dysfunction in the pathogenesis of experimental cerebral malaria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1950-1954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2021.280450	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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		
米国	Wayne State University		