

機関番号：33916  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19591266  
 研究課題名（和文）人工ヒト型抗ロタウイルス中和抗体を利用した、感染防御・治療法の開発  
 研究課題名（英文）Research and development of therapeutic antibodies against human rotavirus infection.  
 研究代表者  
 守口 匡子（MORIGUCHI KYOKO）  
 藤田保健衛生大学・医学部・講師  
 研究者番号：60298528

研究成果の概要（和文）：2006年度までにヒト由来ファージ抗体ライブラリーから単離・定性した抗ヒトロタウイルス（HRV）中和抗体を、ロタウイルス感染の場である腸管で持続的に発現・供給するために、乳酸菌 *Lactococcus Lactis* によるヒト型抗体発現系を確立し、抗体を利用したウイルス感染防御・治療法開発への足がかりを築いた。さらには、ウイルス性胃腸炎のもう一つの主要な病因であるヒトノロウイルス（HuNoV）に対するヒト型ファージ抗体のスクリーニングに着手し、現在までに2つの交叉反応性抗体を含む、42タイプ66クローンの抗HuNoV抗体を単離した。

研究成果の概要（英文）：Expression system of human antibodies in *Lactococcus lactise* was established to be enable to produce the molecules persistently in intestine. We also tried to isolate anti-human norovirus antibodies, and 66 clones (42 types) including 2 cross-reactive antibodies were isolated.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ヒト型ファージ抗体、交叉反応性、ロタウイルス、ノロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトロタウイルス（HRV）感染による下痢症で、地球レベルでは開発国を中心に年間60万人もの乳幼児が死亡しており、その感染力の強さから、衛生状態の如何に関わらず、先進国においても5歳以下のほとんど全ての乳幼児が感染・発症し、医療経済の大きな負担となっている。近年、HRVワクチンが開発され、日本においても承認申請がなされているが、ワクチンは、免疫不全者や臓器移植等

で免疫抑制状態にある患者には使用できない。また、ワクチンでは、免疫を獲得するまでに少なくとも接種後2週間程度を要するため、緊急を要する治療や予防には不適である。

当該研究代表者らは、これまでに、数十人の骨髓、扁桃、臍帯血、及び末梢血より作製されたファージ抗体ライブラリーAIMS4から、ヒト型抗HRV中和抗体3タイプ12クローンを単離し、代表的な3クローン1-2H、2-3E、

2-11G に関する詳細な解析を行ってきた。そして、これら 3 つの抗体はそれぞれ、P[4]と P[8]の交叉反応性、P[6]と P[8]の交叉反応性、G1 特異的中和抗体であることや、これら 3 抗体で様々な HRV 株が中和されること、健常マウスのモデル実験系においてこれら 3 抗体には受動免疫能があることを、示してきた。また、これら抗体が認識する HRV 構造タンパク質上のエピトープ同定を目指し、KU 株 (G1P[8]) を親株として、各抗体に対する抵抗性ウイルス V-1-2H、V-2-3E、V2-11G の単離を行って、それらの遺伝子配列解析を行った。その結果、V-1-2H には VP4 の第 170 アミノ酸、V-2-3E には VP4 の第 203 アミノ酸 (いずれも VP8\*領域)、そして、V-2-11G には VP7 の第 149 アミノ酸に変異が見られること、これらの変異の場所は、多数報告があるマウスの抗 HRV 中和抗体が認識する場所とは異なることが判明し、それは即ち、ヒト型抗体の認識する中和エピトープが、マウス抗体の認識する中和エピトープとは必ずしも一致しないということであり、ヒト型の中和抗体を単離して解析することは、ワクチン開発の観点からも重要であると示唆して来た。

しかし、これら 3 タイプの抗体のみでは、HRV 全ての株を中和することは出来ないことも判明しており、新たなタイプの中和抗体を単離する必要性も示されていた。更に、受動免疫の対象者は、免疫不全・免疫抑制の状態にあることも多く、従って、上記 3 抗体での受動免疫効果を、健常マウスではなく SCID マウスを用いたモデル実験系で評価することも重要と考えられたが、その効果を顕著に認めることは出来なかった。その原因の一つに、抗体の消化管における分子分解が考えられ、従って、中和抗体を利用した感染防御・治療法の開発には、腸管における持続的中和抗体供給システムの構築が必要との着想に至り、乳酸菌によるヒト型抗体の発現系の確立を試みていた。しかし、乳酸菌内在性プロテアーゼにより、発現した抗体分子が即座に分解されてしまう問題を解決できずにいた。

一方、HRV と並び、ウイルス性胃腸炎の主要な病因である HuNoV に関しては、公衆衛生的にもその感染防御・治療法や、安価で簡便なウイルス検出法の開発が急がれているにもかかわらず、当ウイルスの実験室レベルでの増殖系が開発されていないこともあり、ウイルス学的研究はもとより、ヒト型の抗 HuNoV 抗体に関する研究もほとんどなされていなかった。従って、もっぱら、ウイルス増殖系が開発されているマウスノロウイルス (MNV) とマウスを用いたモデル動物実験系における研究報告があるのみであった。

当該研究代表者らは、このような状況下にあった HuNoV に対し、前述の様な HRV に関する研究実績のノウハウを生かして抗 HuNoV 抗

体を網羅的に単離・定性し、交叉反応性中和抗体を選別して、感染防御・治療法の開発を行うと同時に、それら抗体のエピトープを同定してワクチンの設計を行い、更には、中和機序の解明を手がかりにウイルスの感染・増殖機序解明を行って、培養細胞によるウイルス増殖系の確立を目指したいとの着想にも至っていた。

## 2. 研究の目的

(1) 全ての HRV 株が中和可能となる様、複数のヒト由来ファージ抗体ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、交叉反応性を含む新たな抗 HRV 中和抗体を、より多数単離する。また、単離された抗体が認識する、ウイルス構造タンパク質上のエピトープを同定する。

(2) 抗 HRV 中和抗体を、HRV 感染の場である腸管組織において持続的、且つ、安定的に供給できるよう、HtrA プロテアーゼをノックアウトして作製した *Lactococcus lactise* htrA-NZ9000 株によるヒト型抗体発現系を構築する。更には、ヒト型抗体の発現能を獲得した乳酸菌 (形質転換乳酸菌) を健常マウスに経口投与し、腸管への乳酸菌の定着や、腸管におけるヒト型抗体産生の有無を評価する。腸管への定着、並びに、抗体産生が確認された場合には、SCID マウスを用いた受動免疫効果を評価する。

(3) 複数のヒト由来ファージ抗体ライブラリーを用いて抗 HuNoV 抗体の網羅的な単離・定性を行い、第一のリセプターと言われている血液型抗原と HuNoV VLP との結合阻害実験を行う等して、中和抗体の選別を行う。また、それらが認識するウイルス構造タンパク質上のエピトープを同定し、HuNoV ワクチンの設計を行う。更には、交叉反応性を示す抗 HuNoV 抗体を利用した、簡便で安価なウイルス検出キットを開発する。加えて、抗 HuNoV 中和抗体の作用点を検証して HuNoV の感染・増殖機序を解明し、株化細胞による HuNoV 増殖系の確立を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 精製した HRV KU 株ウイルス粒子を抗原に用い、個人の末梢血より作製した 2 つのヒト由来抗体ライブラリー、ASANO 及び NAKASHIMA のスクリーニングを、パニング法にて行った。単離された抗体の KU 株への反応性は、精製 KU 株ウイルス粒子を抗原に、ウサギ抗 cpIII 抗体を二次抗体に、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体を三次抗体に用いた ELISA 法で確認した。更に、抗体遣

伝子を単離してH鎖及びL鎖の超可変領域の塩基配列を決定し、独立クローンを選別した。選別された抗体は、精製効率を上げるために、cpIII型からProtein A型(PP型)に変換した後精製して、MA104細胞を用いた蛍光フォーカス減少法(FF法)にて中和試験を行い、中和抗体を選別した。

(2) これまでに単離・定性されたcpIII型(Fab form)の抗HRV中和抗体1-2H、2-3E、2-11Gを、Fab型のまま、あるいは、各抗体のH鎖およびL鎖の遺伝子を、scFv型に連結し直して、エリスロマイシン抵抗性遺伝子とMyc-tag遺伝子を持つ乳酸菌用発現ベクターpSGAにサブクローニングし、Hrt Aプロテアーゼをノックアウトした乳酸菌htrA-NZ9000株にエレクトロポレーション法にて導入した。エリスロマイシン抵抗性を獲得した乳酸菌をクローニングし、ウエスタンブロット法で抗体分子発現を確認するとともに、抗Myc-tag抗体で抗体分子を精製した後、MA104細胞を用いたFF法にて中和試験を行い、抗体の中和活性を検証した。更には、中和抗体発現能を獲得した形質転換乳酸菌をBALB/cマウス(健常マウス)に経口投与し、腸管に定着して抗体分子を発現するかどうかを検証した。形質転換乳酸菌の定着並びにヒト型抗体分子の産生が確認されれば、同様の実験をSCIDマウスを用いて行う。

(3) バキュロウイルス発現系で作製した、HuNoV Narita 104株(GII/4)の人工ウイルス様空粒子(VLP)を精製して抗原に用い、上記ASANO及びNAKASHIMAの両ライブラリーに加え、数十人の骨髄、扁桃、臍帯血、及び末梢血より作製されたAIMS5の、計3つのヒト由来抗体ライブラリーのスクリーニングを行った。単離された抗体の、交叉反応性を含めた結合活性の検証は、精製VLPを抗原に、ウサギ抗cpIII抗体を二次抗体に、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体を三次抗体に用いたELISA法で行った。更に、抗体遺伝子を単離してH鎖及びL鎖の超可変領域の塩基配列を決定し、独立クローンを選別した。抗体が認識するエピトープ領域は、ウイルス構造タンパク質をドメイン毎にGST融合タンパクとして大腸菌に発現させ、精製した後、ELISA法の抗原として用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) ASANO、NAKASHIMA両ライブラリーに関して、精製KU株ウイルス粒子を抗原に用い、スクリーニングをそれぞれ2回行ったが、新たな抗HRV中和抗体を単離することは出来なかった。異なるG/Pタイプのウイルス株を抗原に用いて、ライブラリーのスクリーニングを行ったり、あるいは、新たなヒト由来抗体

ライブラリーを作製する等の工夫が必要と思われた。

(2) 1-2H、2-3E、2-11Gともに、Fab型の遺伝子カセットを、pSGA発現ベクターにサブクローニングしてhtrA-NZ9000株に導入した場合、発現後の分子アセンブリが上手く行われず、完全な抗体分子を確認することが出来なかった。そこで、各抗体のH鎖及びL鎖遺伝子を、分子アセンブリの必要が無いscFv型に連結し直して、pSGA発現ベクターに組み込み、形質転換に用いた。その結果、1-2Hに関しては、htrA-NZ9000によるscFv型抗体分子の発現がウエスタンブロット法により確認され(NZ:1-2H)、且つ、精製したscFv型抗体のウイルス中和活性もFF法にて確認された。即ち、*Lactococcus lactise*によるヒト型抗体の機能的発現が可能であることが判明した。しかし、他の2クローン(2-3Eと2-11G)に関しては、抗体の分子分解が起きていることがウエスタンブロット法により推測され、且つ、中和活性も確認されなかった。このことから、乳酸菌による機能的ヒト型抗体発現系の構築には、HtrA以外の宿主側プロテアーゼのノックアウト等、更なる改良が必要と考えられた。

次に、乳酸菌のマウス腸管への定着並びにヒト型抗体発現の確認を行うべく、形質転換乳酸菌NZ:1-2HをBALB/cマウスに経口投与した。投与後3日目に腸管を摘出し、腸管洗浄液をエリスロマイシン含有寒天培地に塗布して、1週間継代培養を行った。結果、4クローンのコロニーが回収されたが、いずれのクローンにも、抗体遺伝子を有するプラスミドDNAを確認することは出来ず、また、抗体分子発現も確認されなかった。従って、SCIDマウスを用いた同様の実験は行わなかった。

(3) ASANO、NAKASHIMA、AIMS5ライブラリーとともに、パニングを4回繰り返すことで、抗Narita 104抗体の選別が完了したとのデータが得られたため、1066クローンを単離した。それらに対し、Narita 104株への反応性をELISA法にて検証したところ、897クローンが陽性であった。この897クローンに関し、H鎖及びL鎖の超可変領域の塩基配列を解析した結果、大半が同一クローンであることが判明し、独立クローンは66であった。なお、抗体の反応性は主にH鎖が担うことが知られているため、H鎖超可変領域が同一のものは同タイプの抗体と判断すると、42タイプに分類されることも判明した。次に、これら42タイプの抗体に関し、GI/1、2、3、4、8、並びに、GII/1、3、4、5、6、7、12、14の13種のウイルス株VLPに対する交叉反応性をELISA法にて検証したところ、12A11はGII/1、

3、4、6、12 の、12B10 は GII/1、4、6 の交叉反応性抗体であることが解った。なお、両抗体とも、G/I 群の VLP に対する交叉反応性 (inter-genogroup cross-reactivity) は認められなかった。また、2 人の別人の末梢血から独立して作製された 2 つの異なるライブラリー (ASANO ならびに NAKASHIMA) から、同じタイプの抗体が単離されていることも判明し、これらはドミナントエピトープを捕らえている可能性が示唆された。

次に、交叉反応性を有することが判明した 12A11 および 12B10 が認識する、ウイルス構造タンパク質上の領域を同定するため、VP1 を Nt、S、P の 3 つのドメインに分け、各々を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。これらレコンビナントタンパク質を精製して ELISA 法の抗原として用い、上記両抗体の反応性を検討した結果、いずれも Nt や S ドメインには反応せず、P ドメインに高い反応性を示すことが解った。

今後は、P ドメインをサブドメイン毎に分割して GST に融合させ、抗体の認識部位をより詳細に解析してエピトープの同定を目指すとともに、単離された全ての抗体を用いて、血液型抗原と VLP の結合阻害実験を行い、中和抗体の可能性を検証したい。更には、genogroup I のウイルス株 VLP を抗原に用いた抗体ライブラリーのスクリーニングを行って、inter-genogroup cross-reactive 抗体を含む、抗 HuNoV 抗体の網羅的単離と定性を行いたい。

## 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 守口匡子、白土東子、染谷雄一、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜  
ファージディスプレイ法による広域遺伝子型反応性ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離  
日本薬学会第 131 年会  
2011 年 3 月 28 日 (静岡)
- ② 守口匡子、白土東子、染谷雄一、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜  
ファージディスプレイ法による、ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離  
第 58 回日本ウイルス学会学術集会  
2010 年 11 月 7 日 (徳島)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守口 匡子 (MORIGUCHI KYOKO)  
藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60298528

### (2) 研究分担者

谷口 孝喜 (TANIGUCHI KOKI)  
藤田保健衛生大学・医学部・教授  
研究者番号：40094213