

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07021

研究課題名（和文）ボツリヌス症を治療するヒト型抗体製剤の開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic study for the development of human monoclonal antibodies treating botulism

研究代表者

松村 拓大（Matsumura, Takuhiro）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00456930

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）：ボツリヌス毒素は自然界において最も活性の高い毒素として知られ、血清型A-Gの内A、B、E、Fがヒトにボツリヌス症を引き起こす。本疾患の治療には副作用のない高い活性を持つ中和抗体の開発が求められている。本研究では、B型ボツリヌス毒素を中和するヒト型抗体の機能解析を行い、その中和機構を明らかにした。一方で、A型ボツリヌス毒素特異的ヒト型抗体に関しては、候補となる3種抗体の特異性および結合ドメインの解析を行い、それぞれが異なるエピトープを認識することを明らかにした。さらに、各抗体はBoNT/Aに対して単独で中和活性を示し、3種を組み合わせることにより高い中和効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当研究室において開発したB型ボツリヌス毒素を中和するヒト型抗体2種の作用機序を明らかにした。本結果より、少ない抗体数で効率よく毒素を中和することのできる機構の一端が明らかとなり、今後新しい抗体を開発する際の重要な知見となった。さらにA型ボツリヌス毒素を認識するヒト型抗体3種の結合および中和活性を解析し、最も高い中和活性を示す組合せを決定した。本研究結果によりA型B型毒素に対する抗体セット候補が得られた。今後はヒトに中毒を起こすE型F型についても本研究で得られた知見を参考に抗体を開発し、ウマ抗毒素に替わる安全で生産効率の優れたヒト型抗ボツリヌス毒素抗体セットの開発に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：Botulinum neurotoxin (BoNT) is the most potent natural toxin known. Of the seven BoNT serotypes (A to G), types A, B, E, and F cause human botulism. Treatment of human botulism requires the development of effective toxin-neutralizing antibodies without side effects. In this study, we analyzed the function of human monoclonal antibodies (HuMAbs) neutralizing type B botulinum neurotoxin (BoNT/B), and revealed the mechanisms of action of these HuMAbs. On the other hand, we analyzed the binding and neutralization activity of HuMAbs against type A BoNT (BoNT/A). These HuMAbs recognized non-overlapping epitopes. Furthermore, these HuMAbs showed neutralization activity against BoNT/A individually and three combination of HuMAbs showed a synergistic neutralization effect. These data demonstrate that these HuMAbs against BoNT/B and BoNT/A are promising in terms of a foundation for new human therapeutics for botulism.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス毒素 ボツリヌス症 神経毒素 ヒト型抗体 中和抗体 抗毒素製剤

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス毒素 (BoNT) はグラム陽性偏性嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* 等が産生するタンパク質性の毒素であり、抗原性の違いから A~G 型 7 種類に分類される。BoNT により引き起こされるボツリヌス症は、BoNT を経口的に接種することにより起こる食餌性ボツリヌス症 (ボツリヌス食中毒) と、一歳未満の乳児の腸管内で菌が増殖し、その際産生される BoNT により起こる乳児ボツリヌス症に大別される。いずれの中毒においても、BoNT は末梢の興奮性シナプスに作用し、神経伝達物質の遊離を阻害することにより弛緩性麻痺を引き起こす。BoNT の活性は非常に高く、バイオテロの手段としても懸念されており、アメリカ疾病管理予防センター (CDC) においても国の安全保障に影響を及ぼす最優先病原体 (カテゴリー A) に分類され、国際的にも規制の必要性の高い危険な毒素である。我が国では本症の発生数は多いとはいえないが、乳児ボツリヌス症が増加傾向にあり、2017 年には初めて死者が出ている。また、米国では年間 100 例以上の症例報告があり、東南アジアなどでは数百人規模のアウトブレイクも起きている。

現在、我が国ではヒトの中毒事例が報告されている A、B、E、F 型に対するウマ抗血清が常備されている。ウマ血清を原材料としているこの製剤は、ウマへの免疫が必要であるため作製に長期間を有するのに加え、ヒトにとっては異種タンパクであるため、アナフィラキシー等の血清病を引き起こす危険性がある。乳児ボツリヌス症においてはこのアレルギー反応を回避するためにウマ血清による治療はなされていないのが現状である。また、米国ではヒト由来製剤として、トキソイドワクチンを免疫した健常人から直接免疫グロブリンを採取し、調整した『BabyBIG』が乳児ボツリヌス症を対象として市販されている。しかしこの方法は、トキソイドワクチンを接種することのできる限定されたヒトから得られた血液を集め製造されるため、原材料の確保やバイオハザード等数多くの問題が予想され、我が国においては認可されておらず、ウマ抗血清の代わりに普及させることは困難である。これらの理由から、安全性の向上、生産効率の向上、に加え高い中和活性を持つという点も含めた 3 点の問題を克服した抗毒素製剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトに中毒を起こす血清型 A、B、E、F 型毒素に対する安全で高い中和力価を持ち、なおかつ生産効率の良い抗毒素抗体製剤セットの作出を目指す。申請者はこれまでに、ボツリヌストキソイドワクチン (A、B、E、F 型) を接種したボランティアの末梢血からヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、SPYMEG 細胞と細胞融合することにより、B 型ボツリヌス毒素 (BoNT/B) に対して高い中和活性を持つヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 2 種を樹立することに成功している (Matsumura T *et al*, *Toxins*, 2020、特許)。これらのハイブリドーマから産生される完全ヒト型抗体 M2 は BoNT の軽鎖、M4 は重鎖を認識しマウスバイオアッセイにおいて中和活性を示した。さらに M2 と M4 を組み合わせることにより、中和活性が飛躍的に上がることが明らかになった。これまでの BoNT に対する中和抗体の報告では、高い中和活性を得るためには 3 種類以上の抗体を組み合わせることが必要であった。2 種類でこのような高い中和活性を示すヒト型抗体の報告はなく、本 B 型抗体の中和機構を明らかにすることにより効率よく毒素を中和する知見が得られる可能性がある。

M2 および M4 は完全ヒト型であり安全性が高く乳児にも使用可能である。尚且つ高い中和活性を持ち、細胞から安定して供給できる画期的な抗体製剤であると言える。本 B 型抗体作成の方法や知見を他の血清型毒素に対する抗体作成に用いれば、先進的なボツリヌス症治療薬の開発が

可能である。

3. 研究の方法

抗体による BoNT/B 中和メカニズムの解析

既を取得している BoNT/B に対するヒト型抗体 M2 および M4 が、毒素が活性を示すどの段階に作用しているのか中和メカニズムを明らかにする。具体的には、神経細胞 (PC12 cell 等) への結合、細胞内での translocation (局在)、基質であるシナプス小胞タンパク質 (VAMP2) の切断、それぞれの段階における抗体の作用を解析する。

得られたヒト型抗体の結合活性の解析

得られた抗体の特異性や結合親和性を ELISA により解析する。同じ血清型に対する抗体が複数取得できている場合は、Competition ELISA を行うことにより、それぞれの抗体の認識するエピトープが重複しているかを確認する。

中和力価測定 (マウスバイオアッセイ)

得られた抗体と各血清型 BoNT をプレインキュベートし、マウスへ腹腔内投与する。比較コントロールとして抗体の代わりに PBS を投与した群を用いる。投与後、ボツリヌス症特異的な症状 (腹部の凹み、呼吸困難等) を観察しながら、致死までの時間を測定することにより中和力価を求める。申請者らは BoNT/B に対する抗体 2 種類を組み合わせる事により、単独と比較して中和活性が飛躍的 (数百倍) に高まることを明らかにしている。今回得られた抗体数種類を組み合わせ、中和力価を測定し、最も中和活性の強い組み合わせを決定する。

4. 研究成果

B 型ボツリヌス毒素に対するヒト型抗体の解析

BoNT/B の細胞結合に対する M2 および M4 の作用

BoNT/B の PC12 細胞への結合に対する M2 および M4 の作用を免疫染色により解析した。BoNT/B のレセプター結合ドメイン H₀ を認識する M4 は BoNT/B の細胞への結合を顕著に阻害した。一方で、酵素活性ドメイン L chain を認識する M2 は BoNT/B の結合を阻害せず、増強することが明らかとなった。これは M2 が BoNT/B に結合することにより BoNT/B の構造変化が起き、細胞との相互作用が増強されたか、もしくは BoNT/B が抗体と結合することにより多価になったため細胞との結合性が増強されたことが考えられる。

BoNT/B の酵素活性 (基質の切断) に対する M2 および M4 の作用

BoNT/B の基質である VAMP2 の recombinant タンパク質を用いて BoNT/B L chain の酵素活性に対する M2 および M4 の作用を解析した。その結果、M2 および M4 いずれも BoNT/B L chain の酵素活性を阻害しなかった。M2 は L chain を認識するが、BoNT/B の酵素活性ではなく他の過程を阻害していることが示唆された。

BoNT/B の細胞内局在に対する M2 の作用

BoNT/B の細胞内局在に対する M2 の作用を Pulse chase assay により解析した。未処理 BoNT/B は細胞内に取り込まれた後、60 min 後には細胞内に広く局在していた。一方で M2 処理 BoNT/B は未処理 BoNT/B と同様に細胞内に取り込まれるが、60 min 後には細胞周辺 (細胞膜) 上に局在しており、未処理 BoNT/B とは異なる局在を示した。また膜上に局在している BoNT/B は M2 と共局在していた。さらに非透過処理でも BoNT/B と M2 が膜上に検出されることから細胞外に局在していることも明らかとなった。本結果より、M2 は L chain に結合し、translocation を阻害することにより、BoNT/B を含んだ小胞がリサイクリングによって細胞膜上に輸送されていることが

示唆された。

A 型ボツリヌス毒素に対するヒト型抗体の解析

Competition ELISA によるエピトープ重複の確認

A 型ボツリヌス毒素(BoNT/A)に対するヒト型抗体産生細胞(CHO 細胞)は 4 種が樹立されており、その中でも 3 種(NT-320、BT-015、BT-175)が BoNT/A に特異的に結合した。これらの抗体のエピトープの重複を確認するために Competition ELISA を行った結果、それぞれの抗体は競合せず、異なるエピトープを認識していることが示唆された。この結果より、本抗体は組合せでの使用が可能であることが明らかとなった。

マウスバイオアッセイによる中和活性の解析

BoNT/A1(M-PTC) 500 pg と抗体(NT-320、BT-150、BT-175) 100 µg を混合し、マウスに腹腔内投与することにより抗体の中和効果を解析した。コントロール群(PBS 投与群)と比較して抗体投与群は発症致死が遅延し、単独で中和効果を発揮することが明らかとなった。さらに 2 種、3 種を組み合わせることにより、中和効果が増強され、3 種組合せが最も高い中和活性を示し、BoNT/A1 5.0 ng に対し完全中和を示した(下図)。一方で、異なるサブタイプ BoNT/A2 に対する中和効果を解析した結果、活性は弱く完全中和にはならなかった。NT-320 の BoNT/A2 に対する結合活性が BoNT/A1 と比較して低いことが原因であると考えられた。

| | Numbers of mice (alive/tested) | | | | | |
|-----------|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| | 6 h | 16 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| PBS (cnt) | 2/2 | 0/2 | | | | |
| NT-523** | 2/2 | 0/2 | | | | |
| NT-320 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 1/2 | 1/2* |
| BT-015 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 0/2 | | |
| BT-175 | 2/2 | 2/2 | 0/2 | | | |

*発症あり。
**非特異的抗体。

| | Numbers of mice (alive/tested) | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 4 h | 10 h | 24 h | 36 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| PBS (cnt) | 3/3 | 0/3 | | | | | |
| NT-320 + BT-015 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | | | | |
| NT-320 + BT-175 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| BT-015 + BT-175 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| NT-320 + BT-015 + BT-175 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |

結語

本研究により、BoNT/B に対するヒト型抗体 M4 は BoNT/B の細胞への結合を阻害し、M2 は translocation を阻害することにより中和活性を発揮することが明らかとなった。本成果は、M2 および M4 が少ない抗体数(2 種)で効率よく毒素を中和することのできる機構の一端を明らかにし、今後新しい抗体を開発する際の重要な知見となった。さらに BoNT/A を中和するヒト型抗体において最も高い中和活性を示す組合せを決定した。今後はヒトに中毒を起こす E 型 F 型についても本研究で得られた知見を参考に抗体を開発し、ウマ抗毒素製剤に替わる安全で生産効率の優れた完全ヒト型抗ボツリヌス毒素抗体セットの開発に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Gregg BM, Matsumura T, Wentz TG, Tepp WH, Bradshaw M, Stenmark P, Johnson EA, Fujinaga Y, Pellett S. | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Botulinum neurotoxin X lacks potency in mice and in human neurons | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 mBio | 6. 最初と最後の頁 e0310623 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03106-23. | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kihara K, Kajiyama Y, Kimura Y, Okazaki S, Esa N, Nobe R, Shimizu K, Ohno K, Motooka D, Matsumura T, Shimazu T, Nakamura S, Fujinaga Y, Mochizuki H. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Adult-onset botulism in a Japanese woman with prolonged spore excretion | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 J Infect Chemother | 6. 最初と最後の頁 1172-1176 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2023.08.009. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Amatsu S, Matsumura T, Zuka M, Fujinaga Y. | 4. 巻 299 |
| 2. 論文標題 Molecular engineering of a minimal E-cadherin inhibitor protein derived from Clostridium botulinum hemagglutinin | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 J Biol Chem | 6. 最初と最後の頁 102944 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102944. | 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 Yutani M., Matsumura T., Fujinaga Y. | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Effects of antibiotics on the viability of and toxin production by Clostridium botulinum. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Microbiol Immunol | 6. 最初と最後の頁 432-437 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12928. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takemori-Sakai Y., Satou K., Senda Y., Nakamura Y., Otani H., Maekawa A., Oe H., Oshima M., Yoneda-Nakagawa S., Miyagawa T., Sato K., Ogura H., Mori M., Wada T., Sakai Y., Yutani M., Matsumura T., Fujinaga Y., Gabata T., Wada T., Iwata Y. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Rare toxin A-negative and toxin B-positive strain of Clostridioides difficile from Japan lacking a complete tcdA gene. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Infect Chemother | 6. 最初と最後の頁 651-656 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.015. | 査読の有無 有 |
| 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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口アキ、松村拓大、小林伸英、阿松 翔、藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 抗A型ボツリヌス神経毒素ヒト型モノクローナル抗体の解析 |
| 3. 学会等名 第69回トキシシンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口アキ、松村拓大、藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 A 型ボツリヌス神経毒素に対する治療用ヒト型モノクローナル抗体の開発 |
| 3. 学会等名 第59回日本細菌学会中部支部総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口アキ、松村拓大、小林伸英、阿松 翔、藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 A 型ボツリヌス神経毒素に対するヒト型モノクローナル抗体の開発・解析 |
| 3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松村拓大、阿松 翔、小林伸英、藤永由佳子 |
| 2. 発表標題 Endogenous production and neurotoxicity of novel botulinum neurotoxin (BoNT/X) in a clinical isolate |
| 3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松村 拓大 |
| 2. 発表標題 Clostridium botulinumが引き起こすボツリヌス症の発症機序解明および治療法開発に向けた解析 |
| 3. 学会等名 第 70 回日本感染症学会東日本地方学術集会、第 68 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 阿松 翔、松村 拓大、森本 ちよの、北村 真悠、藤永 由佳子 |
| 2. 発表標題 ボツリヌス毒素複合体と腸管ムチンとの相互作用解析 |
| 3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林 伸英、安部 公博、赤木 佐千代、阿松 翔、松村 拓大、野村 暢彦、尾花 望、藤永 由佳子 |
| 2. 発表標題 ボツリヌス菌および関連するクロストリジウム属細菌が産生するメンブレンベシクルに対する炎症応答の解析 |
| 3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 和輝、阿松 翔、松村 拓大、油谷 雅広、藤永 由佳子 |
| 2. 発表標題 ポツリヌス菌のin vivo局在解析に向けた遺伝子改変技術の確立 |
| 3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|