

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590496

研究課題名(和文) 臨床応用をめざした原虫主要表面抗原に対するヒトモノクローナル抗体の開発

研究課題名(英文) Development of human monoclonal antibodies to major surface antigens of parasitic protozoa for clinical applications

研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10147168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫のメロゾイト表面に存在するMSP-1のC末端側19kDa領域に特異的なヒトモノクローナル抗体Fab断片を完全ヒト抗体分子に改変した。CHO細胞においてIgG1あるいはIgG3として産生させた抗体の親和性は、元のFab断片に比べて約20倍上昇した。赤痢アメーバの表面レクチンを認識するヒトモノクローナル抗体Fab断片についてもIgG1に改変した。これらの完全ヒト抗体は、原虫感染症の予防・診断・治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Whole human monoclonal IgG molecules were prepared from a Fab fragment specific to the C-terminus 19-kDa fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. Affinities of IgG1 and IgG3 molecules produced in CHO cells were approximately 20-fold higher than that of the original Fab fragment. Whole human IgG1 molecule was also prepared from a monoclonal antibody Fab fragment specific for surface lectin of Entamoeba histolytica. These whole human IgG molecules may be applicable for prevention, diagnosis and therapy of protozoan infectious diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：寄生原虫 ヒトモノクローナル抗体 熱帯熱マラリア 赤痢アメーバ症 抗体遺伝子 抗体医薬 表面抗原

1. 研究開始当初の背景

マラリアには年間約3億人が罹患し、熱帯アフリカの乳幼児を中心に100万人近くが死亡していると推定される。わが国でも年間50~100例の輸入マラリアが報告されているが、免疫のない日本人は重症化しやすく、死亡例もでていいる。しかし、マラリアに対して有効なワクチンは未だに実用化されていない。また、薬剤耐性のマラリア原虫が出現・拡散して深刻な問題となっており、特に熱帯熱マラリアへの対策は急務である。これまでに、熱帯熱マラリアに免疫のあるヒトの血清は *in vitro* 系で虫体の増殖を抑制できることが知られており、また、同様の効果を有するマウスモノクローナル抗体もハイブリドーマ法によって作製されている。しかし、マウス抗体をそのままヒトに用いることは困難であり、臨床応用には至っていない。

一方、赤痢アメーバは熱帯・亜熱帯を中心に世界中に分布しているが、年間約5千万人が大腸炎や肝膿瘍を発症し、約10万人が死亡している。わが国でも赤痢アメーバ症は年々増加しているが、特に性感染症として問題であり、HIVとの混合感染例も報告されている。赤痢アメーバに対するヒト抗体の効果についても、動物実験では有効性が確認されているが、臨床応用には至っていない。

研究代表者らはこれまでに、ヒトモノクローナル抗体を大腸菌系で作製するための研究に携わり、赤痢アメーバや熱帯熱マラリア原虫などに特異的なヒト抗体 Fab を作製した。更に赤痢アメーバに中和活性のある完全ヒト抗体の作製にも成功している。そして、これらのヒト抗体遺伝子を解析し、germ-line との比較に基づいて、その構成を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者らが作製してきたヒトモノクローナル抗体には、実際の治療や予防への応用をめざす上で解決しなければならない問題がある。それは、抗体の Fab 断片では原虫の宿主細胞への接着に中和活性はあっても、抗原虫活性が強くないことである。強い殺虫作用を発揮するためには補体依存性細胞傷害 (CDC) や抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) 活性が必要であり、そのためには Fc 部分を含む抗体分子の作製が不可欠である。本研究では、熱帯熱マラリア原虫の merozoite surface protein 1 (MSP-1)、赤痢アメーバのガラクトース・Nアセチルガラクトサミン特異的な表面レクチンの heavy subunit (HGL) に特異的なヒト抗体 Fab 断片などを完全分子として調製し、それらの特性について評価を行う。また、これまでにトランスジェニックマウスを用いて作製した赤痢アメーバのレクチン intermediate subunit (IGL) に対するモノクローナル抗体は IgG2 であるため、CDC や ADCC 活性が弱い。そこで、本研究課題では、より強い抗原虫活性

を発揮できるように IgG1 へ変換することを検討する。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクターの調製

ヒト抗体の H 鎖 Vd 領域をコードする遺伝子から、VH1 に相当する部分を切り出し、IgG1 の H 鎖用発現ベクター pFUSEss-CHIg-hG1 (InvivoGen) と IgG3 の H 鎖用発現ベクター pFUSEss-CHIg-hG3 にそれぞれ組み込んだ。また、L 鎖の全長をコードする遺伝子から、V1 に相当する部分を切り出し、L 鎖用発現ベクター pFUSEss-CLIg-hk に組み込んだ。

(2) 培養哺乳動物細胞における抗体産生

H 鎖用と L 鎖用の 2 つのプラスミドベクターを LyoVec (InvivoGen) によって CHO 細胞あるいは HEK293T 細胞に同時に導入し、形質転換した細胞を Zeocin と Blasticidin を含む培地により選別した。その後、培養上清をスクリーニングし、抗体産生能の高いクローンを選別した。無血清培地に馴化させた後、培地から抗体分子をプロテイン G カラムによって精製した。

(3) 抗体の特性解析

ELISA、ウェスタンブロット、間接蛍光抗体法などによって抗体の特異性を確認した。ELISA では組換え型の各種タンパク質抗原を使用した。

(4) 抗体の親和性解析

精製した抗体について、BIAcore 3000 を用いた表面プラズモン共鳴法により、親和性を測定した。センサーチップは CM5 を使用した。

(5) 抗体遺伝子の解析

抗体産生培養細胞より Total RNA を単離し、RT-PCR で抗体遺伝子を増幅した後、塩基配列解析を行った。

(6) 増殖抑制活性の解析

ヒト O 型赤血球を用い、熱帯熱マラリア原虫 FCR3 株を培養した。培養液にヒトモノクローナル抗体を添加し、24 時間後における感染赤血球の比率を計測した。

4. 研究成果

(1) 抗熱帯熱マラリア原虫ヒトモノクローナル抗体の作製

熱帯熱マラリア原虫のメロゾイト表面に存在する MSP-1 の C 末端側 19kDa 断片 (MSP-1₁₉) を認識するヒトモノクローナル抗体 Fab (Pf25) について、完全分子への改変を行った。CHO 細胞あるいは HEK293T 細胞の培養上清をスクリーニングした結果、IgG1 については 26 陽性クローン、IgG3 については 7 陽性クローンが得られた。これら

の細胞において抗体遺伝子が正しく発現されていることを確認した。そして、IgG1 については13クローン、IgG3については7クローン全てについて、10%のウシ胎児血清を含む培地から無血清培地へと馴化させた。最終的に抗体産生能の高かったクローンが、IgG1では6w7C8と6w7D6、IgG3では4A4B4であった。これらのクローンについて抗体を精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。図1に示すように、還元条件下と非還元条件下で、それぞれ予想されるサイズのバンドが観察された。特に、還元条件下において、IgG1とIgG3のL鎖のサイズは変わらないが、H鎖のサイズについてはIgG3の方がIgG1よりも大きいことを確認できた。

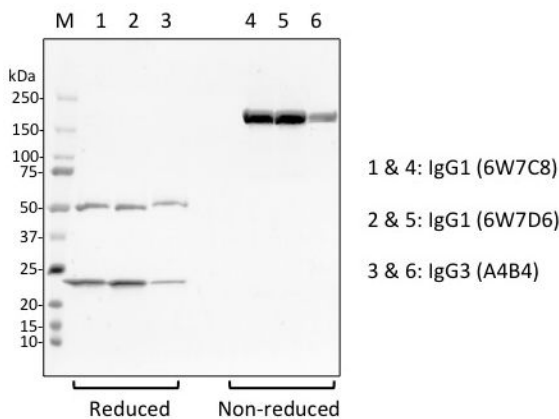


図1. CHO細胞で産生された熱帯熱マラリア原虫MSP-1₁₉ 特異的なヒトモノクローナル抗体のSDS-PAGE解析

(2) 抗熱帯熱マラリア原虫ヒトモノクローナル抗体の特性

熱帯熱マラリア原虫抗原に対する抗体の反応性を検討した結果、Fabと同様の特異性が観察された。また、抗体のMSP-1₁₉に対する親和性を表面プラズモン共鳴法によって測定した(図2)。元のFab断片と比較して、IgG1とIgG3の親和性はともに約20倍の上昇が認められた(表1)。また、抗体による熱帯熱マラリア原虫の増殖抑制効果について予備的検討を行ったところ、100 µg/mlの濃度において、感染率の低下が観察された。

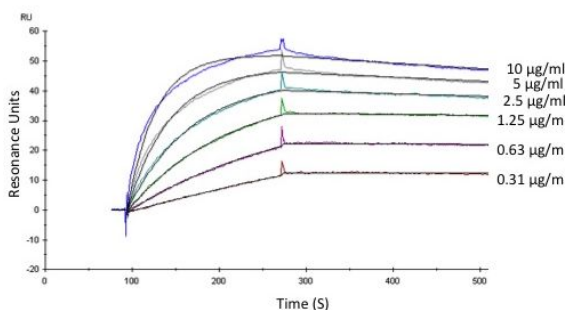


図2. 抗熱帯熱マラリア原虫ヒトモノクローナル抗体6W7C8 (IgG1) のMSP-1₁₉に対する親和性評価

表1. MSP-1₁₉に対するヒトモノクローナル抗体の親和性比較

Antibody	K_A (1/M)	K_D (M)
Fab (Pf25)	9.17×10^8	1.09×10^{-9}
IgG1 (6W7C8)	1.98×10^{10}	5.47×10^{-11}
IgG3 (A4B4)	2.18×10^{10}	6.21×10^{-11}

(3) 抗赤痢アメーバヒトモノクローナル抗体の作製

赤痢アメーバのHGLを認識するヒトモノクローナル抗体 Fab (CP33) について、完全分子への改変を行った。IgG1の6陽性クローンを確立し、1クローン(1A1F1)を無血清培地に馴化させた。産生された完全ヒトモノクローナル抗体が、Fabと同様の特異性を保持していることを確認した。また、赤痢アメーバのIGLを認識するヒトモノクローナル抗体のうち、IGL1に特異的なXEhI-20 (IgG2)、IGL2に特異的なXEhI-B5 (IgG2)、IGL1とIGL2の両方を認識するXEhI-H2 (IgM) について、IgG1への改変を行った。それぞれ複数の陽性クローンを選別し、各1クローンについては無血清培地に馴化させた。

(4) 今後の展望

本研究で作製されたヒトモノクローナル抗体は、感染の成立そのものを完全に阻止することは困難でも、感染症の重篤化を防ぎ、死亡率を下げる即効性で副作用のない抗体医薬としての応用が期待できる。また、本研究では均質なヒト抗体を大量に生産できるので、診断のための虫体抗原検出系への応用なども可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Meng Feng, Tomoyoshi Komiyama, Tetsuo Yanagi, Xunjia Cheng, Jeevan B. Sherchand, Hiroshi Tachibana. Correlation between genotypes of tRNA-linked short tandem repeats in *Entamoeba nuttalli* isolates and the geographical distribution of host rhesus macaques. *Parasitol. Res.*, 査読有, Vol.113, 2014, 367-374
doi: 10.1007/s00436-013-3664-0

Hiroshi Tachibana, Tetsuo Yanagi, Chamala Lama, Kishor Pandey, Meng Feng, Seiki Kobayashi, Jeevan B. Sherchand. Prevalence of *Entamoeba nuttalli* infection in wild rhesus macaques in Nepal and characterization of the parasite isolates. *Parasitol. Int.*, 査読有, Vol.62, 2013, 230-235
doi: 10.1016/j.parint.2013.01.004

Meng Feng, Junlong Cai, Xiangyang Min, Yongfeng Fu, Qing Xu, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng. Prevalence

and genetic diversity of *Entamoeba* species infecting macaques in southwest China. *Parasitol. Res.*, 査読有, Vol.112, 2013, 1529-1536
doi: 10.1007/s00436-013-3299-1
Muxia Luo, Meng Feng, Xiangyang Min, Xueping Li, Junlong Cai, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng. Primary pathogenicity analysis of a Chinese *Entamoeba histolytica* isolate. *BioSci. Trends*, 査読有, Vol.7, 2013, 77-81
doi: 10.5582/bst.2013.v7.2.77
Wang Zhao, Li Zhang, Wenwen Jing, Sixiu Liu, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng, Guodong Sui. An integrated microfluidic device for rapid serodiagnosis of amebiasis. *Biomicrofluidics*, 査読有, Vol.7, 2013, 011101
doi: 10.1063/1.4793222
Bin Yang, Yingdan Chen, Liang Wu, Longqi Xu, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 査読有, Vol.87, 2012, 97-103
doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0626
Meng Feng, Junlong Cai, Bin Yang, Yongfeng Fu, Xiangyang Min, Hiroshi Tachibana, Xunjia Cheng. Unique short tandem repeat nucleotide sequences in *Entamoeba histolytica* isolates from China. *Parasitol. Res.*, 査読有, Vol.111, 2012, 1137-1142
doi: 10.1007/s00436-012-2945-3
Meng Feng, Bin Yang, Liu Yang, Yongfeng Fu, Yijun Zhuang, Longgan Liang, Qing Xu, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana. High prevalence of *Entamoeba* infections in captive long-tailed macaques in China. *Parasitol. Res.*, 査読有, Vol.109, 2011, 1093-1097
doi: 10.1007/s00436-011-2351-2

〔学会発表〕(計5件)

Rattiporn Kosuwin, Meng Feng, Chaturong Putaporntip, Takashi Makiuchi, Hiroshi Tachibana, Somchai Jongwutiwes. Polymorphism in and antibody responses to thrombospondin-related adhesive protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). 第83回日本寄生虫学会大会. 2014年3月28日. 愛媛大学城北キャンパス
Meng Feng, Tomoyoshi Komiyama, Tetsuo Yanagi, Xunjia Cheng, Jeevan B. Sherchand, Hiroshi Tachibana. Correlation between tRNA-linked short tandem repeats genes in *Entamoeba nuttalli* isolates and the geographical

distribution of host macaques. 第83回日本寄生虫学会大会. 2014年3月27日. 愛媛大学城北キャンパス
Xunjia Cheng, Yihong Deng, Wei Ran, Suqin Man, Xueping Li, Hongjian Gao, Wei Tang, Hiroshi Tachibana. Amebicidal activity of artemether by inhibition of phosphoserine aminotransferase synthesis in *Acanthamoeba castellanii*. 第83回日本寄生虫学会大会. 2014年3月27日. 愛媛大学城北キャンパス
Kentaro Kato, Bhim G. Dhoubhadel, Yoshito Fujii, Hiroshi Tachibana. Identification of a carbohydrate recognition domain of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin (Igl). 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月4日. 神戸ポートアイランド
橘 裕司. 赤痢アメーバ症の診断 近縁種との鑑別と多型解析. 静岡県寄生虫研究会第13回研究総会. 2013年9月14日. アクトシティ浜松研修交流センター

〔図書〕(計1件)

Hiroshi Tachibana, Masataka Takekoshi. Springer, Production of antibody Fab fragments in *Escherichia coli*. In: Al-Rubeai. M.(Ed.) Antibody Expression and Production, 2011, 165-178

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/pdf/tatibana_hiroshi_2014_04_01.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA, Hiroshi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10147168

(2)研究協力者

程 訓佳 (CHENG, Xunjia)
復旦大学・医学院・教授
(東海大学・医学部・客員研究員)

付 永鋒 (FU, Yongfeng)
東海大学・医学部・研究員
(復旦大学・医学院・講師)