

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590539

研究課題名(和文) 志賀毒素1と2を交差性に中和するHUSヒト型モノクローナル抗体治療薬の開発

研究課題名(英文) Isolation of humoral monoclonal antibody cross-reactively neutralizing against shiga toxin type 1 and 2 and treating a patient suffering HUS

研究代表者

辻 孝雄 (TSUJI, Takao)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：60171998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌(EHEC)はHUSの原因となるStx1と2を産生する。しかしワクチン開発は成功していない。我々は両毒素に対する経鼻投与ワクチン及び抗体治療薬の作成を試みてきた。その結果ワクチン候補としてStx2B-Hisの作成と抗Stx2B-His抗体が両毒素を交差性に中和すること(Vaccine, 26:469,2008、2092,2008)、経口投与治療薬の可能性のあるStx1と2を交差性中和する二フトリIgYの作成(PLOS One, e26526,2011)に成功した。そこで今回、両毒素を交差性に中和するヒトまたはマウスMAbを分離し、HUS治療薬としての臨床応用を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) produces Stx1 and Stx2 causing severe diseases like hemolytic uremic syndrome (HUS). As there is no vaccine or no curative for these diseases caused by both toxins, we have been trying to isolate monoclonal antibody or polyclonal antibodies cross-reactively neutralizing both toxins. We already reported that nasal subunit-vaccine such as Stx2B-His with a mutant heat-labile enterotoxin induced polyclonal antibodies cross-reactively neutralizing both toxins (Vaccine,24:3591,2006、26:469,2008、26:2092,2008). Then, in this project, we try to isolate a monoclonal antibody, which will neutralize both toxins cross-reactively and use for the treatment of severe diseases like HUS caused by both toxins.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 致死毒素(Stx1と2) 経鼻投与ワクチン ヒトモノクローナル抗体 HUS治療薬

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌(EHEC)は HUS 等の重篤症状を引き起こす原因毒素、志賀毒素 (Stx) を産生する。Stx は 2 種類の亜型 (Stx1 と 2) があり、Stx2 が HUS の主な原因である。そこで抗原性が低いが、副作用の少ない Stx2 の B サブユニット (Stx2B) を用いたワクチン開発が行われてきた。しかし、いまだに成功していない。

我々は Stx1 と 2 を交差性に中和する抗体を誘導する経鼻投与 Stx2 誘導体ワクチン、及び治療薬として両毒素を共に中和するニワトリ IgY やマウスまたはヒト MAb の開発実験を行ってきた。その結果、粘膜アジュバントとして毒素原性大腸菌の LT の変異毒素 (mLT) を用い、マウスの経鼻免疫で Stx2 の中和抗体を誘導する His-tagged Stx2B (Stx2B-His) の作成に成功した。また、抗 Stx2B-His 血清は両毒素を交差性に中和することを明らかにした (*Vaccine*, 24:3591.2006、26.469.2008、26:2092.2008)。さらにニワトリ抗 Stx2B-His IgY が両毒素を交差性に中和することも明らかにし、将来 HUS 予防の経口投与治療薬として利用できることを明らかにした (*PLoS One*, e26526, 2011)。

よって、本企画は第 1 に mLT と Stx2B-His の同時経鼻投与により誘導できた抗 Stx2B-His 抗体が、Stx1 と 2 を交差性に中和することを明らかにした点、独創性が高い。さらに Phage display 法により毒素中和能に優れたヒト型抗 Stx1 モノクローナル抗体 (MAb) の分離にも成功している (*Vaccine*, 29: 5340, 2011)。

そこでこれらの経験を基に、両毒素を同時に中和するマウス MAb の分離

とマウス/ヒトキメラ及びヒト型化抗体への変換、Phage display により両毒素を同時中和するヒト型抗 MAb の分離を行い、HUS の治療薬への応用を試みる。

2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)は HUS の原因となる 2 種類の毒素 (Stx1 と 2) を産生する。しかしワクチン開発は成功していない。我々は両毒素に対する経鼻投与ワクチン及び抗体治療薬の作成を試みてきた。その結果 Stx2 中和抗体を誘導する Stx2B-His の作成とマウス抗 Stx2B-His 血清が Stx1 と 2 を交差性に中和すること、経口投与治療薬の可能性のある Stx1 と 2 を交差性中和するニワトリ IgY の作成、静注用抗 Stx1 ヒトモノクローナル抗体 (MAb) の分離に成功した。

そこで今回、Stx1 と 2 を同時に中和するマウス MAb の分離を行い、分離したマウス MAb のマウス/ヒトキメラ及びヒト型化抗体に変換して、HUS 治療薬への応用を目指す。Phage display により Stx1, 2 を同時中和するヒト型抗 Stx2B-His MAb を分離し、HUS の治療薬を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

1). マウスによる抗体産生の測定

10 µg の mLT と精製 StxBs 蛋白質 10 µg を含む 20 µl のサンプル液を軽麻酔したマウスに経鼻投与する。投与回数は抗原により異なるが、1週間おきに 3 回投与して、最終投与後 4 週目に血清を採取する。血中の抗体価は抗原 (Stx1B-His または Stx2B-His) -ELISA 法により測定する。

2). Stx1.Stx2 の中和抗体の検出

in vitroにおける血清及びMAbの中和能力の検出は、Hela 229細胞を用いて行う。同細胞を培養後、抗体未処理及び処理済みのStx1と2の各毒素を培養液に加えて、AlamarBlue (Trek Diagnostic Systems, West Sussex, UK) 法により致死細胞を検出する。また、in vivoにおける中和実験は、毒素量がStx1, 200 µg/kgまたはStx2, 2 µg/kgに相当するように調整したサンプル液をマウスの腹腔内に投与し、その致死率を検討する。

3). Stx2B-誘導体に対する MAb の分離

Stx2B-誘導体とmLTで3回自己免疫疾患マウス(BXSB)の経鼻投与を行い、4週間後に脾臓を摘出して、既報に従いマウス P3u-1 細胞とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行う。既報に準じてHAT培地で2週間、HT培地で1週間培養し、融合細胞を選択する。そしてStx1B-His または Stx2B-His-ELISA で交差抗体産生細胞を選択する。クロニングは2回以上行う。同時に in vitroでの毒素を交差性に中和しているかHela 229細胞を用いて検討する。

4). マウスMAbをマウス/ヒトキメラ及びヒト型化抗体に変換

マウス MAb のマウス/ヒトキメラ及びヒト型化抗体への変換は、本学総合医科学研究所の黒澤教授との共同実験で行う。ヒト抗体にマウスMAbの抗原結合ドメイン Fv を入れ替えたマウス/ヒトキメラ抗体を作成する。さらに、Fvドメイン上の配列でマウス MAb の抗原結合に直接かかわる相補性決定領域(CDR: complementary determining region) を CDR グラフト技術によってヒト抗体のフレームに埋め込み、ヒト型化抗体を作成する。

5). Phage display 法による抗 Stx1, 2, 交差性中和 MAbの分離

本学総合医科学研究所の黒澤教授は、数種類の大規模なナイーブファージ抗体ラブラリを構築している。我々は、このライブラリーを用いて、ジフテリア毒素 (*Infect. Immun.* 74:3682.2006) と Stx1 抗体に対するヒト MAb (*Vaccin.*29:5340,2011)の分離に成功している。

4. 研究成果

Stx1,Stx2 を同時に中和するマウス MAb を分離し、マウス/ヒトキメラ及びヒト型化抗体に変換し、HUS 治療薬を開発する目的に関して。

本目的を達成するため、ワクチン抗原として Stx2B-Hisを用いて、マウス MAb の分離を行った。その結果、Stx1,2の両毒素を同時に中和する抗 Stx2B MAbを、数種類分離することに成功した。しかしながら、これらのMAbsはStx2を効果的に中和するが、Stx1の中和能は非常に低かった。

従って、Stx2Bを認識するこれらのMAbsは、Stx2Bの受容体結合部位自体を認識しているが、Stx1Bの受容体結合部位の近隣を認識している可能性が示唆された。また、これらのMAbsはStx2の治療薬としては、効果的であるがStx1の治療薬としては、不適切であると考えられる (*Microbiol. Mimmunol.* 59:71-81.2015)。

そこで、これらのMAbsの中、最も効果的にStx2を中和する抗Stx2BMAb、2種類に関して、現在マウス/ヒトキメラ型化抗体に変換を試み、その性質を解析している。

Phage displayによりStx1,2を同時に中和するヒト型抗 Stx2B-His MAb を分離し、HUS の治療薬を開発する目的に関して。

Stx1B-His, 2B-His ELISA を用いて、Stx1,2 の各々単独と Stx1,2 同時中和するヒト型抗 Stx2B single-chain variable fragment (scFv) の分離を、総合医科学研究所の黒沢教授との共同実験で試みてきた。その結果、Stx1,2 に交差性に結合するが、両毒素を同時に中和する scFv は分離出来なかった。また、Stx2 に単独に結合する scFv の分離に成功したが、Stx2 の中和能がほとんど認められなかった。これは、Phage display ラブラリーの調整のためサンプルをご提供頂いたヒト達が、十分に Stx2 に被爆していなかったか、それとも Stx2 に対して十分に反応しなかったかを示している。

一方、Stx2B-His を用いたスクリーニングで、Stx1 への結合能力および中和能力のある scFv の分離に成功していることから (*Vaccine*, 29:5340, 2011)、Stx1B, Stx2B の受容体結合部位の構造および抗原性が異なり、この scFv が Stx1B の受容体結合部位を認識しているが、Stx2B では受容体結合部位の近傍を認識していることを示唆している。

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)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Ide T, Komoto S, Moriguchi K, Win Htun K, Myint Y Y, Mya T W, Thant K Z, Thu H M, Win M M, Oo H N, Htu T, Wakuda M, Dennis F E, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen S V, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K.. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Myanmar PLoS One. e0124965. 査読有, 2015.
2. Arimitsu H, Sasaki K, Iba, Y; Kurosawa,

- Y; Shimizu, T; Tsuji, T. Isolation of B subunit-specific monoclonal antibody clones that strongly neutralize the toxicity of Shiga toxin 2. Microbiol Immunol. 59 ; 71-81. 査読有, 2015.
3. Arimitsu H, Sasaki K, Kohda T, Shimizu T, Tsuji T. Evaluation of Shiga toxin 2e-specific chicken egg yolk immunoglobulin: production and neutralization activity. Microbiol Immunol. 58(11):643-8. 査読有, 2014
4. Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirato H, Tsuji T, Ichinose Y, Taniguchi K. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. Infect Genet Evol. Oct;27:277-93. 査読有, 2014
5. Arimitsu H, Sasaki K, Shimizu T, Tsukamoto K, Shimizu T and Tsuji T. Large-scale preparation of Shiga toxin 2 in Escherichia coli for toxoid vaccine antigen production. Microbiol Immunol. 57(1):38-45. 査読有, 2013.
6. Arimitsu H, Sasaki K, Kojima H, Yanaka T, Tsuji T. Simple Method for Shiga Toxin 2e Purification by Affinity Chromatography via Binding to the Divinyl Sulfone Group. PLoS One. Dec 10;8(12):e83577. 査読有, 2013.
7. Neri P, Tokoro S, Sugiyama T, Umeda K, Shimizu T, Tsuji T, Kodama Y, Mori H. Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing IgY antibody Biol. Pharm. Bull. 35 (6) 917-923 . 査読有, 2012.
8. Rahman S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Taniguchi K, Icatlo FC Jr, Tsuji T, Kodama Y, Van Nguyen S, Umeda K, Oo HN, Myint YY,

Htut T, Myint SS, Thura K, Thu HM, Fatmawati NN, Oguma K. Randomized placebo-controlled clinical trial of immunoglobulin Y as adjunct to standard supportive therapy for rotavirus-associated diarrhea among pediatric patients. *Vaccine*;30(31):4661-9. 査読有, 2012.

9. Kim SY, Honda S, Tsuji T, BangSH. Correlation Coefficient between various Fac.related with the oral environment in technical high School Students..Internal J Clinical preventive Dentistry 8, 7-14. 査読有, 2012.

10. Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Nakamura K, Tanaka Y, Nuemket N, Taniguchi K, Kozaki S, Tsuji T. P19 embryonal carcinoma cells exhibit high sensitivity to botulinum type C and D/C mosaic neurotoxins.. *Microbiol Immunol.*, 56(10):664-72. 査読有, 2012

11. Maina EK, Hu DL, Tsuji T, Omoe K, Nakane A. Staphylococcal enterotoxin A has potent superantigenic and emetic activities but not diarrheagenic activity. *Int J Med Microbiol.*302(2):88-95. 査読有, 2012.

12. Tynan GA, McNaughton A, Jarnicki A, Tsuji T, Lavelle EC. Polymyxin B inadequately quenches the effects of contaminating lipopolysaccharide on murine dendritic cells. *PLoS One.*; 7(5): e37261. 査読有, 2012.

〔学会発表〕(計7件)

1. Arimitsu H, Sasaki K, Tsuji T. Characterization of Shiga toxin 2-specific monoclonal antibodies. 49th U.S.-Japan Conference on Cholera and Other Enteric Bacterial Infections; Gainesville, FL. USA. 2015.

2. 有満秀幸, 佐々木慶子, 辻孝雄. 毒性を中和する抗 Shiga toxin 2 モノクロー

ナル抗体の作製. 第88回日本細菌学会総会; 岐阜. 長良川国際会議場. 3月26日~28, 2015

塚本健太郎, 尾関千賀子, 幸田知子, 辻孝雄. ボツリヌスC型毒素の神経細胞への取り込みと細胞内局在. 第88回日本細菌学会総会; 岐阜. 長良川国際会議場. 3月26日~28日, 2015.

3. Arimitsu H, Sasaki K, Tsuji T. Simple purification method of Shiga toxin 2e. 48th US-Japan Cooperative Medical Sciences Program Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections; Dhaka, Bangladesh. 2014.

4. 有満秀幸, 佐々木慶子, 辻孝雄. Shiga toxin2 を中和するモノクローナル抗体の作製及び性状解析. 第51回日本細菌学会中部支部総会; 金沢市, 北陸大学. 10月17日~18日 2014

5. 塚本健太郎, 尾関千賀子, 幸田知子, 辻孝雄. ゲノム編集技術によるボツリヌスC型神経毒素低感受性細胞の作製. 第51回日本細菌学会中部支部総会; 金沢市, 北陸大学. 10月17日~18日, 2014

6. 塚本健太郎, 尾関千賀子, 幸田知子, 辻孝雄. ボツリヌスC型神経毒素の細胞内動態の可視化と細胞内侵入機構について. 第61回トキシシンポジウム; 徳島県鳴門市, ルネッサンスリゾートナルト, 9月3日~5日, 2014.

7. 有満秀幸, 佐々木慶子, 辻孝雄. ジビニルスルホン基を介した志賀毒素バリエント Stx2eのアフィニティ精製法. 第87回日本細菌学会総会; 東京, タワーホール船堀, 月26日~28日 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

辻 孝雄 (TSUJI Takao)
藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：

60171998

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：