

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成 13 年度採択研究代表者

宇田 泰三

(県立広島大学生命環境学部 教授)

「健康・福祉のためのナノバイオ材料およびバイオ素子としての
「スーパー抗体酵素」の創製」

1. 研究実施の概要

「スーパー抗体酵素」(Antigenase) は抗体でありながら標的とするタンパク質抗原を酵素的に分解(破壊)することのできるユニークな性質を有している。本研究では悪性細菌や悪性ウイルスに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を意図的に作製し、また作製した「スーパー抗体酵素」(Antigenase)がどの程度の酵素活性や抗原認識能をもつのか、さらには悪性細菌や悪性ウイルスに対してどの程度の有用性を示すのかを解明し応用することにある。

17年度の計画書にあるように、*Helicobacter pylori*(*H.pylori*) urease に対する Antigenase については、これまでに取得した数種類の Antigenase (HpU-9, -20, UA-15 など)は *H.pylori* urease を特異的に分解する事は判明しており、次のステップは臨床応用を目指した試験に移行することであった。そこで今年度は、Antigenase の濃度、量、活性化条件、*H.pylori*に対する最適反応条件などを探索し、その条件をほぼ決定した。また、in vivo 試験に必要な Antigenase の大量製造を行い、*H.pylori* のマウス胃内への定着実験、引き続き Antigenase の投与による in vivo 試験に着手し、いくつかの興味ある結果を得た。また、ピロリ菌に対する Antigenase の関連特許の提出が完了したのでやっと論文投稿を終え、いくつか掲載され始めた。

HIV の感染に深く関与する chemokine receptor CCR5 の第2細胞外領域を標的にした「スーパー抗体酵素」(Antigenase)については、その作製をすでに終えているが、新たに CCR5 の N 末端領域を狙った「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の取得に成功した。CCR5 発現細胞を使った試験で、CCR5 分子を特異的に分解した。これにより次に、第2細胞外領域および N 末端領域の2カ所を同時に攻撃できるいわゆる「複合ナノターゲティングシステム」を目指した新手法の研究に発展できる。

インフルエンザウイルスに対しては、昨年度、感染に深く関与するヘマグルチニンを狙った「スーパー抗体酵素」(Antigenase)に成功したので、今年度はそのキャラクタリゼーションを行い、抗原分解活性(kcat)の非常に高いサブユニットの抽出に成功した。また、抗体の X 線結

晶構造解析に着手し、酵素活性発現機構を構造面から解析している。

Antigenase 41S-2-L 等の酵素活性発現メカニズムの解明と効率的作製法についての検討では、Antigenase 41S-2-L が multimer(複合体)形成をすることで強い酵素活性を発揮すると結論したが、その原因究明を行った結果、いくつかの有用な新証拠を得た。

昨年度に引き続き、今年度も Antigenase の概念を広く世界に知らしめる努力を学会活動を通して行った。ただし、論文発表は特許申請後投稿しているので遅れ気味にあり、早急に改善するつもりである。

ヒト抗体酵素軽鎖(Bence Jones Protein : BJP) を用いた研究で、BJP には正常腎培養細胞に傷害性を有し、病原性を示すものがあることをこれまでの研究で示した。この細胞傷害性は阻害剤によって BJP の酵素活性を抑制すると消失することから、その細胞傷害性は BJP の酵素活性が関与していることが示された。

このことから抗体酵素活性を阻害剤によって抑制することにより抗体酵素の病原性を低下させ、臨床への応用をはかることが可能となる事が示唆された。

臨床で応用されている蛋白分解酵素阻害剤数種を用いて細胞傷害性 BJP の酵素活性抑制試験を行った結果、BJP の酵素活性を抑制し更には細胞傷害性を抑制する阻害剤があった。これを利用して臨床的に傷害を示す BJP の活性を阻害し病気の発症・進展の抑制につながる可能性がある。

さらに BJP の抗体酵素活性と細胞傷害性との関係を示すため、BJP 発現大腸菌モデルを作製した。これにより大腸菌発現 BJP を用いた酵素・細胞傷害活性の測定、また活性残基に変転異導入による酵素・細胞傷害活性の変化を調べる。

また種々の BJP を用いて細胞傷害性をスクリーニングした結果、正常細胞に傷害性を示さず癌細胞に特異的に傷害を与える BJP を取得した。この細胞傷害性 BJP のアミノ酸配列から塩基配列を決定し大腸菌発現 BJP を作製した。この発現モデルを改良して細胞傷害性の効率化を図っている。

一方で、ヒト型抗体酵素の取得について、患者末梢リンパ球からファージディスプレイによりヒト Fab 型抗体ライブラリーの構築を行い、この中から抗体酵素活性を有するクローンを選別する方法を確立する事に取り組み、興味ある性質を示すいくつかのヒト型抗体の取得に成功した。今後は酵素活性の有無に取り組む。

バイオ素子開発では、抗体修飾リポソームと電解発光を組み合わせたセンシング法を構築しているが、この新規な方法で抗原の高感度検出に成功している。今後、kcat の高い抗体酵素を用いたバイオ素子への展開に移る予定である。

本研究はいろんな角度からの検討を行ってきたが、今後、学術的視点からは Antigenase の構造解析を含む活性発現の本質の解明が、また、応用的視点からは Antigenase による悪性細菌およびウイルス感染からの予防および治療に向けた研究開発が、急務となってきた。

2. 研究実施内容

研究目的:

- 1, エイズウイルスやインフルエンザウイルス、さらには胃潰瘍(or 胃ガン)の原因菌とされるピロリ菌やインフルエンザなどの悪性細菌および悪性ウイルスを取り上げ、感染に深く関与している分子を標的にして抗体を作製する。そして、これらの抗体 subunit から標的分子を酵素的に破壊する Antigenase を取得し、新規医薬品開発の道を切り拓く。また、複数の標的分子(あるいは標的部位)に対して攻撃可能な複数の Antigenase の取得を行い、複合ナノターゲティング材料の開発も視野に入れる。さらに学問的に Antigenase の本質を解明するとともに、効率的に作製する手法およびヒト型の Antigenase の取得方法を開発する。
- 2, BJP(ヒト抗体軽鎖)の酵素活性が細胞傷害性に関与するかどうかを大腸菌発現モデルを用いて明らかにする
- 3, 癌細胞を傷害する抗体軽鎖を見出し、その大腸菌発現モデルを作製する。
- 4, 抗体酵素を用いたバイオ素子を構築する。

方法:

・抗体の作製

タンパクあるいは合成ペプチド抗原を intact の状態で Balb/c マウス免疫し、通常のポリエチレングリコールを用いる通常の細胞融合を行った後、HAT 選択及びスクリーニング、クローニングの後に抗体産生ハイブリドーマを確立した。モノクローナル抗体はマウス腹水より採取・精製した。

・H 鎖および L 鎖の分離と精製

精製したモノクローナル抗体に対して 0.2 M β -メルカプトエタノールによる還元反応と、0.3 M ヨードアセトアミドによるアルキル化反応を行い、H 鎖と L 鎖に分離した。引き続き、6 M グアニジンを用いた溶離液とするサイズ排除 HPLC により H 鎖と L 鎖に精製した。この精製した H 鎖および L 鎖溶液は、PBS に対する透析によって Refolding した後に、反応条件に合わせて buffer 交換した。

・分解反応試験

合成ペプチドを基質として使用した場合は、滅菌済みの試験管内にペプチド(60–120 μ M)と H 鎖または L 鎖(0.4–0.8 μ M)を加えて 25°C で反応させ、ペプチドの濃度変化を逆相 HPLC で分析した。タンパク質抗原の場合は SDS-PAGE (silver-staining) または western blotting によりその分解過程を追跡した。

・マウスでの *in vivo* 試験

まず、ピロリ菌を複数回、経口的にマウスに投与し、ピロリ菌の定着を確認する。ついで、緩衝液に溶解させた Antigenase を同じく経口投与し、その効果をマウスの胃を摘出してピロリ菌の定着数を調べる事により行った。

・抗体の三次元立体構造解析

抗体可変領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。このアミノ酸配列、または Protein Data Bank に登録されている抗体のアミノ酸配列を元に、ソフトウェア AbM (Oxford Molecular 社)を使って三次元構造を構築した。続いて Discover (Molecular Simulations 社)を用いてエネルギーの最小化を行った。

・ヒト抗体:

ヒト白血球ライブラリーから大腸菌発現モデルを作製した。

癌細胞傷害性 BJP のアミノ酸配列を決定した。その配列から塩基配列を想定し合成した。これをベクターに組み込み大腸菌に取り込ませてBJPを発現させた。

・抗体修飾リポソームの調製

ホスファチジルコリンジパルミトイル (DPPC)、コレステロール、活性化型ホスファチジルエタノールアミンを用いて超音波法によりルテニウム錯体内封活性型リポソームを調製した。この活性型リポソームに BSA 抗体を結合し、ゲルろ過して抗体修飾リポソームを精製した。

・電極反応

種々の濃度の BSA 溶液と抗体修飾リポソームの一定量を BSA 修飾金電極チップ上に加え、競合反応をさせた。その後、電極チップ上の溶液を除き、緩衝液で洗浄した。金電極チップ上にエタノールを加え、加熱 (60℃) し、結合したリポソームを破壊した。漏れ出たルテニウム錯体は金電極に吸着しているので、この電極を再度緩衝液を洗浄後、電解発光測定装置にセットした。続いて、電圧を印加 (+1.2 V vs. Ag/AgCl) し、発光強度を測定した。

結論:

① *Helicobacter pylori* urease に対しては HpU 系列および UA 系列の「スーパー抗体酵素」(Antigenase)を数種類以上取得している。これらはどれも *Helicobacter pylori* urease を特異的に分解するだけでなく、培養して生存状態にある *Helicobacter pylori* 菌を使った実験においても、特異的に urease を分解した。これらの Antigenase をピロリ菌定着マウスへ投与するべく、詳細な条件検討を行った後、現在 in vivo 試験を実施しているところである。

② エイズウイルスの感染阻止を計るために、chemokine receptor CCR5 分子の第2細胞外領域およびN末端領域のそれぞれを標的とする「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の作製に成功した。これら Antigenase はそれぞれ CCR5 発現 MOLT-4 細胞を使用して CCR に対する反応性調べたところ、ともに CCR を特異的に分解する事を突き止めた。(特許申請完了)

③ インフルエンザウイルスに対する「スーパー抗体酵素」(Antigenase)大量に調製し、その抗原 (hemagglutinin) 分解能を詳細に調べた。高い kcat を有する Antigenase は数時間〜10時間でウイルスの hemagglutinin をほとんど分解した。(特許申請完了)

④ ヒトおよびマウスの germline 解析から、より効率的なかつより正確にヒト型 Antigenase を作製する手法を見いだした。特に軽鎖 V2-14 が注目すべき germline である。(特許申請完了)

⑤ リウマチや COPD の原因物質のひとつとしてよく知られている TNF・に対する Antigenase の開発に成功した。(特許申請完了)

- ⑥ヒト白血球ライブラリーからBJP発現率がよい数十種類の大腸菌発現モデルを得た。発現BJPには酵素活性を有するもの、また有しないものがあることが判明した。
- ⑦癌細胞傷害性大腸菌発現モデルを得た。発現BJPは酵素活性を有した。また、天然型BJPに比べて弱い細胞傷害性を示した。
- ⑧ワクチン接種後のヒト末梢血をもちいて、ファージディスプレイ法により興味ある機能を有するヒト型抗体の作製に成功した。
- ⑨バイオ素子の実験では、ルテニウム錯体を内封した抗体修飾リポソームを調製方法確立し、高感度測定を行っている。

3. 研究実施体制

「宇田グループ」

- ①研究分担グループ長：宇田 泰三（県立広島大学生命環境学部、教授）
- ②研究項目：
- 1, *Helicobacter pylori* urease に対する Antigenase の in vitro および in vivo 試験
 - 2, HIV のコレセプターCCR-5 に対する Antigenase の in vitro および in vivo 試験の実施
 - 3, インフルエンザウイルスに対する Antigenase の開発
 - 4, 抗体酵素の抗原分解活性発現メカニズムの解明
 - 5, ヒト型 Antigenase の作製
 - 6, Antigenase の細胞内への輸送法および multi-targeting を指向したナノバイオ材料の開発
 - 7, Antigenase の医薬品としての開発
 - 8, 新規な「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の作製

「松浦グループ」

- ①研究分担グループ長：松浦 欽司（花田医院、院長・非常勤研究員）
- ②研究項目：
- 1, recombinant Bence Jones Protein モデル(rBJP)の作製と検討
 - 2, 抗体酵素(Bence Jones protein)の細胞障害機序の解明
 - 3, 抗体酵素の癌治療への応用
 - 4, 抗体酵素(Bence Jones protein)の抗原の同定
 - 5, 抗体酵素による潰瘍性大腸炎の診断
 - 6, 抗体酵素の阻害剤の検討

「西園グループ」

- ①研究分担グループ長：西園 晃（大分大学医学部、教授）
- ②研究項目：
- 1, マウスを用いた in vivo での抗体酵素の効果確認

- 2, ヒト型抗体ライブラリーからの抗体酵素の選別
- 3, 酵母発現系を用いた抗体酵素の大量発現システムの構築

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1） 論文（原著論文）発表

- Investigation of active form of catalytic antibody light chain 41S-2-L. Yukie Mitsuda, Kumi Tsuruhata, Emi Hifumi, Masahiro Takagi, and Taizo Uda, Immunol. Lett., 96(1), 63-71(2005).
- Broadly distributed nucleophilic reactivity of proteins coordinated with specific ligand binding activity. Y. Nishiyama, Y. Mitsuda, H. Taguchi, S. Planque, M. Hara, S. Karle, CV. Hanson, T. Uda, S. Paul, J. Mol. Recognit. 18, 295-306(2005).
- Specific degradation of *H. pylori* urease by a catalytic antibody light chain. Emi Hifumi, Kenji Hattuchi, Takuro Okuda, Akira Nishizono, Yoshiko Okamura, Taizo Uda, FEBS J. (Eur. J. Biochem.), 272, 4497-4505(2005) .
- Determination of nonionic surfactants by electrochemiluminescence of Tris(2,2'-bipyridine)-ruthenium complex leaked from destruction of a liposome. N. Egasira, Y. Mitoma, H. Tashiro, T. Uda, ITE Lett., 6(5), (2005).
- A catalytic antibody heavy chain HpU-2 degrading its epitope and *H. pylori* urease. E. Hifumi, Y. Yamada, T. Uda, Immunol. Lett., 103, 68-74(2006).
- Antigenase (スーパー抗体酵素) による HIV の感染阻止を目指して
一二三恵美、宇田泰三、未来材料、5(7), 41-45(2005).
- “抗原を分解する抗体”の展開、
一二三恵美、岡村好子、宇田泰三、科学、75(11), 1254-1259(2005).
- *H. pylori* ウレアーゼを破壊する「スーパー抗体酵素」(アンチゲナーゼ)、
宇田泰三、一二三恵美、岡村好子、日本臨床、64(2), 286-292(2006).

（2） 特許出願

H17 年度出願件数：5 件（CREST 研究期間累積件数：14 件）