

宇田泰三

大分大学工学部応用化学科・教授

高機能分子「スーパー抗体酵素」の自動合成装置と大量合成

## § 1. 研究実施体制

### (1)「宇田」グループ

① 研究代表者: 宇田 泰三(大分大学工学部応用化学科、教授)

#### ② 研究項目

- ・ワクチン接種者(狂犬病など)からの血液採取
- ・ヒト型抗体軽鎖のライブラリー化と抗体酵素バンクの作製
- ・ワクチン接種者からのヒト型抗体軽鎖遺伝子の取得
- ・ヒト型抗体軽鎖遺伝子を用いての最適発現系の探索(プラスミド、宿主など)
- ・ヒト抗体軽鎖遺伝子の発現条件・精製条件等の検討
- ・ワクチン接種ボランティアより構築された軽鎖ライブラリーの生化学的、免疫学的観点からの網羅的解析。
- ・抗原特異的結合・分解活性を有するクローンの選別と抗体酵素バンクの作製
- ・抗体酵素の立体構造と活性
- ・高純度大量培養法の確立
- ・細胞を使った *in vitro* での抗ウイルス活性試験
- ・マウスを使った *in vivo* での効能試験
- ・マウスを使つての急性毒性試験
- ・投与方法の検討

### (2)「Kaveri」グループ(フランス:INSERM)

① 主たる共同研究者: Sрни Kaveri (INSERM、Professor&Director)

#### ② 研究項目

- ・患者血清や IVIg からの抗体酵素の精製

- ・抗体酵素の高濃度化(疎水性クロマトの組み合わせによる)
- ・敗血症、血友病への効能研究
- ・患者からのモノクローナルなヒト型 IgM および IgG 抗体酵素の取得

## § 2. 研究実施内容

### 2-1 宇田グループ

#### 2-1-1 抗狂犬病ウイルス活性試験

##### 2-1-1-1 *in vitro* 試験 (狂犬病ウイルス)

発現・精製したヒト型抗体軽鎖の抗狂犬病ウイルス活性を *in vitro* で評価し、動物実験へ進めるクローンをスクリーニングすることを目的として実験した。抗狂犬病ウイルス活性については、感染ウイルスにより培養細胞に出現した感染フォーカスの抑制数で評価してきた。即ち、あらかじめ軽鎖分子を添加しない条件下(ウイルスコントロール)でウイルスを 25°C の下、24 あるいは 48 時間置き、この条件下での残存ウイルスの感染価を計測し、これを 100%とする対照群に対し、軽鎖分子の添加により感染フォーカス数がどの程度に変化したかを%として表わす Focus Reduction Neutralization Test (FRNT)である。なるべく多くの抗体軽鎖サンプルを評価したいこと、さらにサンプル量の軽減化も図りたい等の理由から、今年度は 96 穴のマイクロプレートを利用した評価系を確立した。ウイルスは狂犬病ウイルス HEP 株を使用し、最適な感受性細胞として Na (C1300) 株を用いて FRNT を行った。フォーカスは、細胞固定後、蛍光標識した抗狂犬病ウイルス単クローン抗体で染色し、蛍光顕微鏡下で計数した。その結果、10 種類のクローンについて、48 時間の反応で効果が期待できる結果が得られた(表1)。そのうち 24 時間の反応でも効果があったものは、2 クローン(#4C220A,#18)であった。これらは、いずれも以下に示す動物実験でも効果が見られた。

表1 抗狂犬病ウイルス(HEP 株)活性を示した抗体軽鎖

Clone	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	24h反応				48h反応				<i>in vivo</i>	
		1回目 (%FFU)	1回目 誤差	2回目 (%FFU)	2回目 誤差	1回目 (%FFU)	1回目 誤差	2回目 (%FFU)	2回目 誤差		
Donor A	C89	40	92%	12%	91%	12%	69%	16%	67%	17%	
	C29	40	100%	18%	96%	23%	59%	12%	72%	9%	
	23F1 C220A	287	143%	4%	137%	9%	64%	28%	55%	8%	効果なし
		67.4	161%	3%	143%	11%	33%	9%	60%	6%	
	23D4 C220A	11.48	113%	15%	119%	6%	40%	6%	52%	7%	効果なし
		244	103%	16%	88%	10%	47%	9%	70%	5%	
		48.8	73%	9%	89%	13%	29%	2%	55%	3%	
	22F6 C220A	9.76	71%	1%	82%	6%	29%	8%	52%	9%	効果なし
1.952		42%	17%	97%	4%	28%	2%	53%	8%		
Donor B	22F6 C220A	31.6	90%	2%	75%	4%	58%	8%	76%	5%	効果なし
	#2	6.72	104%	6%	78%	3%	67%	15%	60%	1%	効果なし
		43.8	75%	5%	83%	2%	42%	8%	52%	6%	
	#4 C220A	8.76	53%	4%	61%	12%	39%	12%	60%	9%	やや効果あり
		1.752	53%	7%	102%	12%	41%	12%	55%	3%	
	#4	34	95%	8%	113%	5%	71%	3%	73%	5%	
#11	14.2	138%	9%	114%	15%	67%	2%	73%	3%	やや効果あり	
#18	59.25	37%	5%	49%	8%	24%	2%	28%	8%	効果あり	

### 2-1-1-2 *in vivo* 試験 (狂犬病ウイルス)

高純度に精製したいくつかの抗体軽鎖をもちいて、マウスとして ddY マウス 6 週齢♀を、また、ウイルス株として CVS-SMB4 110326 ( $8.2 \times 10^7$  FFU/ml)を用いて抗体酵素処理したウイルスと処理しないウイルスを直接マウスの脳内に  $30 \mu\text{L}$  接種する事により評価した。

上述した *in vitro* 試験で#18 クローンが感染抑制に有効である事が示された。このクローンは他にも DNase 活性を有している特徴的なクローンである。そこで、このクローンを用いて *in vivo* 試験を実施した。実験条件は上述の通りである。結果を図1に示す。縦軸がマウスの生存率、横軸がマウスに狂犬病ウイルス(およびそれを抗体酵素で処理したウイルス)の脳内投与後の経過日数である。ウイルスを PBS と混ぜて投与したマウス群では11日目に全匹死亡している。また、*in vitro* 試験において効果の見られなかった#2 クローンではやはり、12日目に全匹が死亡している。これに対し#18 クローンの  $0.94\text{mg/ml}$  の濃度で投

与した群では死亡開始日が遅れているのと、12日後も1匹が生き残っている。 $5.0\text{mg/ml}$  と濃度を高めた群では12日経過しても6割が生き残っており、明かな感染抑制を示すことが解った<sup>1)</sup>。

また、現在、*In vivo*における抗体酵素の狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス活性の評価のため、大量培養に成功した2つの抗体酵素クローンについて次段階の実験に移行している。狂犬病ウイルス感染モデルマウスを用いてあらかじめウイルスと抗体酵素を反応させたものを脳内に接種し、マウスの生残をみる前処理実験と、あらかじめウイルスを脳内に接種し、その後脳内でのウイルス増殖を抗体酵素が抑制することができるかをみるいわゆる治療実験である。

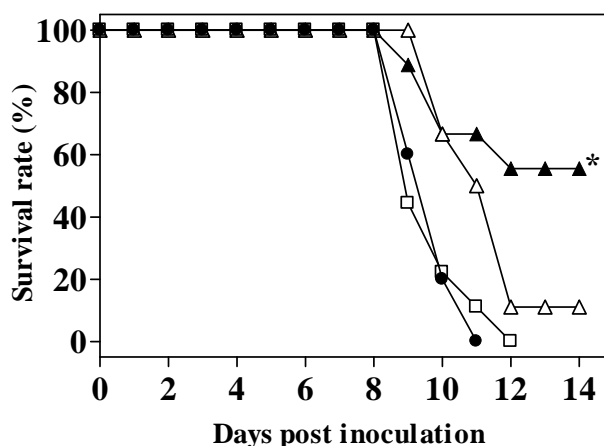


図1 ヒト型「スーパー抗体酵素」による狂犬病ウイルス感染の *in vivo* 試験  
● : PBS のみ、□ : #2 クローン、  
△ : #18 クローン( $0.94\text{mg/ml}$ )、  
▲ : #18 クローン( $5.0\text{mg/ml}$ )  
\* $p < 0.0073$

### 2-1-2 抗インフルエンザウイルス活性試験

#### 2-1-2-1 *in vitro* 試験 (インフルエンザウイルス)

これまでに、マウス型抗体酵素では *in vitro* 試験で有効であることが証明されたが<sup>2)</sup>、今年度はヒト型抗体酵素(約 30 種類)を用いて A 型インフルエンザウイルスに対する感染抑制効果を調べた。A 型インフルエンザウイルス(H1N1, H3N2)とヒト型抗体軽鎖とを混合し、 $25^\circ\text{C}$ で 24 時間インキュベートした後、MDCK 細胞をコートした 6 穴プレートにその反応液を接種した。その後、通常の方法で 2 日間培養してプラークを観察して評価した

H1N1 型ウイルスを用いた *in vitro* 試験では感染を 20%程度抑制するクローンが数種類みつかっ

た。興味あることにいくつかのクローンは核酸分解活性も有していた。一方、H3N2 型ウイルスを用いた試験では多くのクローンにおいて感染抑制が見られ、その効果は最大で 40%を超えた。また、抗体軽鎖はモノマーの状態で存在している場合よりダイマーを形成した場合の方が抑制効果は高くなる傾向にあった。

#### 2-1-2-2 *in vivo* 試験 (インフルエンザウイルス)

いくつかの *in vitro* 試験で有効であったクローンについて Balb/c マウスを用いて経鼻投与による *in vivo* 試験を実施した。数クローンにおいて有意な感染抑制が認められた。

#### 2-2 Kaveri グループ

フランスグループは血液凝固第 VIII 因子に対してプロテアーゼ活性を有するヒト型の IgM モノクローナル抗体の可変領域をクローニングする手法を標準化した。次に、その重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現ベクターに挿入して HEK293 細胞に形質転換し、両遺伝子を共発現をさせて重鎖・軽鎖の結合した完全な抗体として得た。

また、IgG が高い酵素活性を有する慢性の腎臓移植疾患患者の血球を採取して可変領域の遺伝子をクローニングした。今後は、腎臓移植後長期生存している患者から分離した IgG について抗体酵素の活性を調べる予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Emi Hifumi, Eijirou Honjo, Naoko Fujimoto, Mitsue Arakawa, Akira Nishizono, Taizo Uda: Highly efficient method of preparing human catalytic antibody light chains and their biological characteristics. *FASEB J.* Dec 28, 2011

2. Emi Hifumi, Shinnichi Takao, Naoko Fujimoto, Taizo Uda, Catalytic and biochemical features of a monoclonal antibody heavy chain, JN1-2, raised against a synthetic peptide with hemagglutinin molecule of influenza virus, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(38), 15015-24(2011). (DOI: 10.1021/ja203922r)

3. Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman, Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji, Akira Nishizono. Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. *Vaccine*. 2011 29: 1036-1040(DOI : 10.1016/j.vaccine.2010.11.052.)

4. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, Akira Nishizono. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch Virol*. 2011 156: 659-669 (DOI: 10.1007/s00705-010-0905-8)
5. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, and Akira Nishizono: Novel sylvatic rabies virus variant in endangered golden palm civet, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*. 2011 17(12): 2346-2349 (DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110811>)
6. Moazzem Hossain, Kamruddin Ahmed, Tania Bulbul, Sohrab Hossain, Rahman A, Nezam Uddin Biswas, Akira Nishizono: Human rabies in rural Bangladesh. *Epidemiol Infect*. 2011 Dec 20:1-8. (DOI: 10.1017/S095026881100272X)
7. Kentaro Yamada, Chun-Ho Park, Kazuko Noguchi, Daisuke Kojima, Tatsuya Kubo, Naoyuki Komiya, Takashi Matsumoto, Marcelo Takahiro Mitui, Kamruddin Ahmed, Kinjiro Morimoto, Satoshi Inoue, Akira Nishizono: Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res*. 2012 165: 34-45. (DOI: 10.1016/j.virusres.2012.01.002)
8. Bharath Wootla, Olivier D. Christophe, Ankit Mahendra, Jordan D. Dimitrov, Yohann Repesse', Ve'ronique Ollivier, Alain Friboulet, Annie Borel-Derlon, Herve' Levesque, Jeanne-Yvonne Borg, Sebastien Andre, Jagadeesh Bayry, Thierry Calvez, Srinivas V. Kaveri, Se'bastien Lacroix-Desmazes, Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia, *Blood*, 117, 2252-2264(2011). (DOI: 10.1182/blood-2010-07-296103)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 10 件)