

サイトメガロウイルスに対する 完全ヒト型モノクローナル抗体の作製と性状解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 サイトメガロウイルス (CMV) はヒトに広く侵淫しているウイルスであり、胎児の先天性感染による死産や中枢神経系障害および免疫不全宿主での感染症（間質性肺炎、肝炎、胃炎）が問題となっている。CMV 高力価免疫グロブリンは先天性感染の予防や移植患者における CMV 感染症の予防に効果があることが報告されており、抗体は CMV 感染症の治療に有効と考えられる。しかし、CMV 高力価免疫グロブリンは安定的な確保の点で問題があり、CMV 感染症の治療薬としてモノクローナル抗体の開発が期待されている。

抗体医薬開発は 1990 年代から盛んになり、この 20 年間で大きく発展した。当初はマウス抗体やキメラ抗体の開発が主流であり、アナフィラキシーショックなどの問題があったが、現在ではヒト化抗体、完全ヒト型抗体の開発が主流となっている。完全ヒト型抗体作製法の一つに Epstein-Barr ウイルス (EBV) 法がある。この方法は EBV がヒトの B リンパ球をトランスフォームし無限増殖させる活性を利用し、増殖した B リンパ球から目的の抗体を産生する細胞を分離するものである。EBV による抗体作製法は 30 年以上前からある技術であるが、目的の抗体を産生する細胞クローンを分離するのは技術的に難しく、成功例は少ない。

本研究では、CMV 感染症の新たな治療薬となりうる抗体の開発を目的として、EBV 法による CMV 抗体の作製を行った。

【材料と方法】 CMV 抗体の作製：CMV エンベロープタンパク質の中和抗体結合領域を組換えタンパク質として調製し、CMV 抗原とした。CMV 抗体のスクリーニングは CMV 抗原を使用した ELISA で行った。CMV 抗体産生細胞獲得のため、CMV 抗体価の高いボランティアの血液から B リンパ球を分離し、EBV を感染した。EBV によりトランスフォームした B リンパ球（リンパ芽球様細胞：LCL）は培養とスクリーニングを繰り返し、最終的に限界希釈培養により CMV 抗体産生 LCL を分離した。CMV 抗体は抗体産生 LCL の培養上清から proteinA カラムを使用して精製した。

CMV 抗体の性状解析：CMV 抗原に対する結合性、アイソタイプ、ウイルス粒子への結合性は ELISA で確認した。ウイルス抗原との反応性は CMV 感染細胞を使用したウェスタンブロットにより確認した。中和活性評価はプラークアッセイもしくは免疫染色により行った。エピトープマッピングは CMV 抗原の一部を欠失させた抗原を用いウェスタンブロットにより行った。アフィニティー解析は SPR 法により行った。

抗体遺伝子クローニングと発現：抗体産生 LCL から抗体重鎖および軽鎖遺伝子をクローニングし、CHO-K1 細胞に導入して抗体安定発現株を作製した。

抗体の糖鎖解析と修飾：抗体定常領域に結合する N 型糖鎖の構造解析は株式会社グライエンスに外注した。抗体産生 LCL からクローニングした β 1,4-galactosyltransferase (β

1, 4GT) 遺伝子は CHO-K1 細胞の抗体安定発現株に導入した。

【結果】 本研究において、CMV 抗体のスクリーニングには CMV エンベロープタンパク質 glycoprotein B (gB:gp58 および gp116) と glycoprotein H (gH:gp86) の中和抗体結合領域を抗原として使用した。20 回の試行から CMV 抗体産生 LCL を 3 つ獲得し、その中で安定した抗体産生が認められた 1 つの LCL が産生する抗体 (G3D) について性状解析を行った。G3D は CMV の gB (gp58) に対する補体依存性の中和抗体であり、IC₅₀ は 1.2 μg/ml、アフィニティーは 1.7×10^{-10} (M) と高い値を示し、医薬候補として十分な活性を示した。G3D の結合領域は CMV gB (gp58) の Antigenic Domain1 (AD1) に含まれる 50 のアミノ酸からなる領域であった。

ついで、大量生産を目的として、G3D 抗体産生 LCL から抗体遺伝子をクローニングし、CHO-K1 細胞に導入した。しかし、CHO-K1 細胞由来抗体 (G3D-CHO) は LCL 由来抗体 (G3D-LCL) と比較して、中和活性が 1/40 に低下した。この中和活性の違いの原因は抗体定常領域に結合する N 型糖鎖の構造にあると考え、G3D-LCL および G3D-CHO の糖鎖解析を行った。その結果、G3D-CHO では N 型糖鎖が短く、末端にガラクトースが付加されているものが少なかった。G3D-CHO の N 型糖鎖末端構造を G3D-LCL 型にするため、CHO-K1 細胞の抗体安定発現株に糖鎖修飾酵素である β 1, 4GT 遺伝子を導入した。その結果、CHO-K1 細胞由来糖鎖修飾抗体 (G3D-CHO+Gal) の N 型糖鎖末端には G3D-LCL と同等のレベルにまでガラクトースが付加され、中和活性も G3D-LCL と同等のレベルにまで回復した。

【考察】 本研究で獲得した CMV の gB (gp58) に対する中和モノクローナル抗体は CMV 高力価免疫グロブリンよりも優れた CMV 感染症治療薬として期待できる。

本研究で、CHO-K1 細胞で産生された CMV 抗体の補体依存性の中和活性は LCL 由来抗体の 1/40 にまで低下した。抗体定常領域に結合する N 型糖鎖末端からガラクトースを除去すると補体活性化カスケードの第 1 成分である C1q と抗体の親和性が低下し、補体依存性細胞障害活性 (CDC 活性) が低下するとの報告がある。本研究でも CMV 抗体の補体依存性の中和活性に対する糖鎖の影響を検討し、この糖鎖のガラクトース末端構造が重要な要素であることが明らかとなった。CHO 細胞は抗体の生産に広く使用されているが、本研究の結果から、CHO 細胞では産生される抗体の定常領域に結合する N 型糖鎖は短く、末端にガラクトースが付加されないため、補体依存性の中和活性の高い抗体は作製できないことが明らかとなった。しかし、CHO 細胞に糖鎖修飾酵素 (β 1, 4GT) を発現させることにより、この糖鎖末端にガラクトースを付加することが可能であり、CHO 細胞による補体依存性の中和活性の高い抗体の生産法となりうることが明らかとなった。

ヒトの血液リンパ球から作製する抗体はナチュラルな免疫応答と親和性成熟の過程を経ているため高いアフィニティーを有するものが得られる。EBV 法はヒトの血液リンパ球をソースとして、活性の高い完全ヒト型モノクローナル抗体を作製することのできる優れた技術であり今後の抗体医薬開発において中心的な技術の一つになるだろう

【結論】 本研究において、EBV 法により CMV の gB (gp58) に対する補体依存性の中和活性を有する完全ヒト型モノクローナル抗体を作製した。作製した抗体の中和活性は高く、医薬候補として有望な抗体であった。しかし、CHO 細胞で産生した抗体の補体依存性の中和活性は著しく低下していた。また、CHO 細胞が産生した抗体には定常領域に結合する N 型糖鎖末端にガラクトースが付加されていないことが明らかとなった。そこで、抗体を産生する CHO 細胞に糖鎖修飾酵素 (β 1, 4GT) を発現させたところ、抗体定常領域の N 型糖鎖末端にガラクトースが付加され、補体依存性の中和活性が回復することが明らかとなった。EBV 法は活性の高い完全ヒト型モノクローナル抗体を作製することのできる優れた技術であることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 田 賢 藏

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 有 賀 正

学 位 論 文 題 名

サイトメガロウイルスに対する 完全ヒト型モノクローナル抗体の作製と性状解析

ヒトに広く侵淫しているサイトメガロウイルス (CMV) の臨床における問題には胎児の先天性感染や免疫不全宿主での感染症がある。CMV 感染症の治療には抗ウイルス薬ガンシクロピルが使用されているが、骨髄抑制の副作用などから使用できない場合も多い。また、CMV 高力価免疫グロブリンも CMV 感染症の予防や治療に使用されるが、供給や力価の点で問題がある。近年、抗体医薬が次々と医薬品として認可されている。CMV 感染症の治療薬としても、副作用が少なく、高い力価をもったモノクローナル抗体医薬の開発が期待されることから、本論文は CMV 感染症の新たな治療薬となりうる CMV 抗体の開発を目的とした。

抗体開発は完全ヒト型モノクローナル抗体作製法の 1 つである Epstein-Barr ウイルス (EBV) 法で行った。この方法は EBV がヒトの B リンパ球を無限増殖させる活性を利用し、増殖した B リンパ球 (Lymphoblastoid cell line, LCL) から目的抗体産生細胞を分離するものである。申請者はさらに抗体作製効率化のため、抗体遺伝子をクローニングし、他のホスト細胞で抗体産生させる系の開発も目指した。

申請者は CMV 抗体を 3 つ作製し、その中の 1 つの抗体 (G3D) について性状解析を行った。G3D は CMV のグリコプロテイン B の gp58 に結合し、補体依存性の中和抗体であった。G3D の中和活性は $IC_{50}=1.2 \mu\text{g/ml}$ 、アフィニティーは $1.7 \times 10^{-10}\text{M}$ といずれも高い値を示した。またエピトープマッピングを行い、G3D の gp58 における結合領域を特定した。さらに、G3D の抗体遺伝子をクローニングし、抗体産生に適しているとされる CHO 細胞や NSO 細胞における抗体産生系を開発した。

しかし、CHO 細胞で産生された G3D は中和活性が非常に低いことが判明した。G3D が補体依存性の中和抗体であることから、活性低下の原因として抗体定常領域に結合する糖鎖に着目した。抗体定常領域の糖鎖は抗体のエフェクター機能に影響を及ぼすもので、補体活性化にも関与しており、複合体糖鎖の非還元末端のガラクトース (Gal) が重要である。次いで、糖鎖解析を行い、LCL 産生 G3D では 2 つの非還元末端に Gal が付加された G2 構造糖鎖が 80% 以上を占めている一方、CHO 産生 G3D の糖鎖には Gal がほとんど付加されていないことを明らかにした。この結果から、抗体糖鎖の Gal 末端が G3D の中和活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。その検証のため、CHO 産生 G3D の糖鎖への Gal 付加による中和活性の回復を試みた。複合体糖鎖への Gal 付加に関わる酵素 $\beta 1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ ($\beta 1, 4\text{GT}$) 遺伝子を G3D 産生 CHO に導入、発現させた結果、G3D の糖鎖の G2 構造は 70% 以上となった。この Gal を付加した CHO 産生 G3D の中和活性は $2.5 \mu\text{g/ml}$ となり、LCL 産生 G3D と同等のレベルにまで中和活性の回復が認められた。

申請者は、EBV 法により、 $Kd10^{-10}$ (M) レベルのアフィニティーの高い抗体を作製した。

この結果を踏まえ、ヒトBリンパ球の抗体ソースとしての利点からEBV法について考察した。抗体作製の手法には大きく分けてハイブリドーマ法とEBV法がある。ハイブリドーマ法ではマウスの脾臓リンパ球を抗体ソースとして使用している。これは、過剰な抗原でマウスを免疫することで、短期間に誘導、活性化された抗体産生細胞であり、産生する抗体のアフィニティーは低く、高くとも $Kd10^{-9}$ (M) レベルである。一方、EBV法が使用するヒトBリンパ球は自然免疫すなわち少ない抗原による活性化を長期間、繰り返し受け、アフィニティー成熟過程を経ており、産生する抗体のアフィニティーは $Kd10^{-10} \sim 10^{-11}$ (M) レベルに達する。このことから、ヒトBリンパ球を抗体ソースとして使用するEBV法はアフィニティーの高い抗体を作製する手法として優れていると結論した。

さらに、補体依存性活性を有するG3DをCHO細胞で産生すると、著しく活性が低下することを発見し、原因はCHO産生G3Dの糖鎖にGalが付加されていないためであることを明らかにした。この結果から、CHO細胞は抗体生産に汎用されているが、補体依存性活性を有する抗体の生産には不向きであると結論した。また、解決策の1つとして、 $\beta 1,4GT$ をCHO細胞に発現させる方法を提案した。

主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約20分に渡って学位論文ないような発表を行った。その後、副査の有賀教授から中和活性と補体依存性の関連、抗体のC1q結合性が糖鎖構造により異なることを確認したか、LCL抗体からガラクトースを除くと補体依存性の中和活性が低下することを確認したかの質問があった。次いで、副査の今村教授からCHO細胞で産生させた抗体の中和活性が低下した原因として糖鎖に着目した理由、ガラクトース以外の糖鎖が補体依存性中和活性に影響を与える可能性があるのか、生体内でも糖鎖構造の違いが中和活性に重要と考えられるかの質問があった。最後に、主査の高田教授から、今回の観察はウイルスの中和活性に関するものであったが、糖鎖のガラクトース構造は抗体の癌細胞に対する補体依存性細胞障害活性においても重要と考えられるかの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の実験結果やこれまでの文献を参考に適切な回答を行った。

この論文は、医薬品として有望なCMV抗体を開発し、さらにその性状解析から抗体定常領域の糖鎖へのガラクトース付加が補体依存性抗体活性に重要であることを明らかにしたことで高く評価され、今後の補体依存性抗体開発にも大きく貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。