

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名：(日本語) 特殊な血液製剤や遺伝子組換え製剤の製造等に関する研究
(英語) Development of recombinant hyperimmune globulins

研究開発担当者 (日本語) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所・所長 佐竹 正博
所属 役職 氏名：(英語) Japanese Red Cross Central Blood Institute, Director, Masahiro Satake
実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 抗 D および抗 HBs 抗体遺伝子のクローニング
開発課題名：(英語) Cloning of anti-HBs and anti-RhD IgG genes from human B cells
研究開発分担者 (日本語) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所・参事 (兼) 近畿ブロック血液センター・課長 古田 里佳
所属 役職 氏名：(英語) Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center, Senior Investigator, Rika A. Furuta

分担研究 (日本語) ヒト組み換え抗体の作製と機能解析
開発課題名：(英語) Cloning and functional analysis of recombinant human and mouse-human chimeric IgGs
研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・プロジェクトリーダー 安居 輝人
所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Laboratory of Infectious Diseases and Immunity, Project leader, Teruhito Yasui

分担研究 (日本語) 破傷風菌毒素抗体の機能評価
開発課題名：(英語) Functional analysis of anti-TT antibodies.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学・教授 藤永由佳子
所属 役職 氏名：(英語) Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Sciences,

Kanazawa University, Professor, Yukako Fujinaga

分 担 研 究 （日本語）抗 HBs 抗体の機能評価

開 発 課 題 名 : （英 語）Functional analysis of anti-HBs antibodies.

研究開発分担者 （日本語）国立大学法人大阪大学・教授 上田 啓次

所属 役職 氏名 : （英 語）Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of
Medicine, Osaka University, Professor, Keiji Ueda

II. 成果の概要（総括研究報告）

本開発研究では、原料血漿の国内確保が極めて困難な状況にある3つの特殊免疫グロブリン製剤（抗HBs、抗破傷風、及び抗D免疫グロブリン製剤）について、遺伝子組換え型免疫グロブリン製剤の開発を目指し、ヒトおよびマウス-ヒト化目的抗体遺伝子単離を行っている。

1. ヒトB細胞由来抗体遺伝子の単離

HBV ワクチンを追加接種したボランティア血液を材料に以下3通りの方法を用いて抗体遺伝子単離を試み、現在も継続中である。メモリーB細胞の分化誘導培養法では、7,392個のメモリーB細胞を抗体産生細胞へ分化誘導培養し、培養上清ELISAで上位12細胞クローンから抗体遺伝子を単離した。抗原特異的Single cell sorting法では、HBs抗原がB細胞表面へ広範に非特異結合することが予備検討より明らかとなったので、まず反応条件最適化を行うために代替細胞を用意した。IgG陰性培養B細胞株へ、抗HBs抗体遺伝子（すでに文献報告されている核酸配列を元にV領域を人工合成し、膜結合型IgG発現ベクターに組込んだH鎖・L鎖用プラスミド）を遺伝子導入することで、ソーティングのターゲット細胞代用品とした。この細胞を用いて抗HBs抗体発現細胞検出条件の最適化を完了したので、次年度は実際のソーティングと遺伝子単離を行う予定である。EBウイルスを用いたハイブリドーマ法では、2名の協力者由来のB細胞から、ELISA陽性4クローンのハイブリドーマ樹立に成功した。

RhD抗体については、日本赤十字社が保有する抗RhD抗体産生ハイブリドーマの中から抗体力価が強く、反応エピトープが異なると予想されている2クローンを選び、それぞれのハイブリドーマから抗体遺伝子を単離し、抗体遺伝子配列決定とIgG発現ベクター作成を行った。並行して、熱力学的構造解析による*in silico*抗体アミノ酸配列最適化のために、RhDタンパク質をタグ付き組換え型として哺乳類細胞、昆虫細胞、バクテリアでの発現を試みている（佐竹、古田、安居）。

2. マウスを用いた組換え血液製剤のシーズ収集とヒト化

マウスに破傷風毒素抗原（TT）サブユニット（Hn、Hc及びLc）をそれぞれ免疫し、抗TT抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。その結果、Hcに対するハイブリドーマクローンを25種類同定した。さらに、それらクローンのうち、IgG₁サブクラスを有する抗体遺伝子について、4種類の遺伝子クローニングを終了した。現在、リコンビナント抗体を作製し、その抗原特異性を確認するとともに、X線結晶構造解析により、抗原結合性に重要なアミノ酸残基の決定を行っている。その結果をもとに抗体構造にかかわるアミノ酸配列のヒト化を順次行う予定である（安居）。また、並行して抗体による破傷風毒素の中和活性を評価する方法について検討中である（藤永）。

3. 遺伝子組換え抗体の機能評価

抗HBs抗体の機能評価に関連して、市販HBs ELISAキットで検出できないHBsのモノクローナル抗体作成を試み、幾つかの陽性ハイブリドーマを得た。今後、これらのハイブリドーマが実際に本HBsに反応するかどうかを検証する（上田）。

4. 抗体分子の大量発現および精製に関する検討

遺伝子組換え抗体のスクリーニングには、高い発現量が期待される浮遊型293系細胞（Expi293F™ cell）を8%CO₂存在下で振盪培養する方法を採用した。しかしながら、これまでに日欧米で認可された抗体医薬品のうち、ヒト化抗体およびヒト抗体の産生細胞としては約60%がchinese hamster由来のCHO細胞またはその亜株である（2016年12月末現在）。そこで、来年度より浮遊型CHO細胞の2段階温度調整下振盪培養法を導入するために、複数のCO₂培養機内に振盪器を設置し、振盪器モータによる発熱状態などを調整中である（古田）。

In Japan, three kinds of hyperimmune globulins are currently approved: hepatitis B immune globulin (HBIG), human tetanus immune globulin (HTIG), and human RhO (D) immune globulin (HDIG), but they are made from fractionated human plasma predominantly imported from abroad yet. To produce blood products domestically, we are developing alternative recombinant antibodies.

1. Cloning immunoglobulin G (IgG) genes from human B cells

Satake and Furuta are isolating anti-hepatitis B surface antigen (HBs) IgG genes by using three different human B cell resources: *in vitro* cultured, EBV-infected, or antigen-bound sorted memory B cells. All B cells were collected from individuals that were positive for the anti-HBs antibody (HBsAb) and who had been additionally vaccinated in order to obtain a higher titer of HBsAb under the national vaccine program for domestic production of HBIG. So far, we have cloned 12 IgG pairs (H and L chain) from *in vitro* cultured B cells and established four hybridoma cell lines from EVB-infected B cells. For antigen-specific single memory B cell sorting, we have optimized conditions allowing for the detection of HBs antigen (HBsAg)-bound memory B cells. In the coming fiscal year, we will start sorting the target memory B cells and cloning anti-HBs IgG genes. To produce the recombinant HDIG, Furuta cloned two anti-RhD IgG gene pairs from hybridoma cell lines that had been established for producing antibodies as test reagents at Japanese Red Cross. Yasui and Furuta are also purifying the recombinant RhD protein expressed in several host organisms for *in silico* modification/optimization of anti-RhD IgGs through structural analysis.

2. Cloning mouse IgGs for humanized-mouse recombinant antibody production

Yasui immunized mice with tetanus toxin (TT) subunits (Hn, Hc, and Lc) and established TT hybridoma cell lines. From 25 hybridoma clones that produced anti-Hc antibodies, four IgG₁ gene pairs were cloned. Currently, Yasui is characterizing these recombinant antibodies to identify the essential amino acid residues for antigen binding. Once complete, the humanized amino acid residues will be determined.

3. Functional analysis of recombinant antibodies

To evaluate the recombinant HBsAbs, Ueda and Yasui established hybridoma cell lines that produced HBsAbs undetected by the conventional ELISA. Binding capacity of these antibodies will be determined. Fujinaga is developing assay methods for the evaluation of neutralizing activity by the recombinant TT antibodies.

4. Large scale expression of recombinant antibodies

Of all the approved recombinant antibody drugs in the Occident until the end of 2016, over 60% of the *in vitro* culture systems utilized Chinese hamster ovary (CHO) cells or its derivatives. Therefore, Furuta is preparing a CHO cell culture system in which a suspension of CHO subcell lines is cultivated with 8% CO₂.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 9件）

1. Yamagishi N, Furui Y, Koshinami S, Ichijo K, Shimizu Y, Hoshi Y, Gotanda Y, Miyakawa K, Uchida S, Tadokoro K, Nagai T, Satake M. Sequence analysis of two variable cytomegalovirus genes for distinction between transfusion- and breast milk-transmitted infections in a very-low-birthweight infant. *Transfusion*. 2016 Jun;56(6):1305-1310.
2. Abe H, Shiba M, Niibe Y, Tadokoro K, Satake M. Reduction of bacteria and human immunodeficiency virus Type 1 infectivity of platelet suspension in plasma using xenon flash-pulse light in a bench-scale trial. *Transfusion*. 2016 Sep;56(9):2256-66.
3. Matsumoto C, Shinohara N, Sobata R, Uchida S, Satake M, Tadokoro K. Genetic Analysis of HIV-1 in Japan: a Comprehensive Analysis of Donated Blood. *Jpn J Infect Dis*. 2017 Mar 24;70(2):136-142.
4. Isa K, Sasaki K, Ogasawara K, Saito M, Tsuneyama H, Yabe R, Uchikawa M, Satake M. Prevalence of RHD alleles in Japanese individuals with weak D phenotype: Identification of 20 new RHD alleles. *Vox Sang*. 2016 Oct;111(3):315-319.
5. Tezuka K, Kuramitsu M, Okuma K, Nojima K, Araki K, Shinohara N, Matsumoto C, Satake M, Takasaki T, Saijo M, Kurane I, Hamaguchi I. Development of a novel dengue virus serotype-specific multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for blood screening. *Transfusion*. 2016 Dec;56(12):3094-3100
6. Satake M, Iwanaga M, Sagara Y, Watanabe T, Okuma K, Hamaguchi I. Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan: a nationwide retrospective cohort analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016 Nov;16(11):1246-1254.
7. Satake M, Matsubayashi K, Hoshi Y, Taira R, Furui Y, Kokudo N, Akamatsu N, Yoshizumi T, Ohkohchi N, Okamoto H, Miyoshi M, Tamura A, Fuse K, Tadokoro K. Unique clinical courses of transfusion-transmitted hepatitis E in patients with immunosuppression. *Transfusion*. 2017 Feb;57(2):280-288.
8. Matsumoto C, Sagara Y, Sobata R, Inoue Y, Morita M, Uchida S, Kiyokawa H, Satake M, Tadokoro K. Analysis of HTLV-1 proviral load (PVL) and antibody detected with various kinds of tests in Japanese blood donors to understand the relationship between PVL and antibody level and to gain insights toward better antibody testing. *J Med Virol*. 2017 Mar 2. doi: 10.1002/jmv.24802. [Epub ahead of print]
9. Minamitani T, Ma Y, Zhou H, Kida H, Tsai CY, Obana M, Okuzaki D, Fujio Y, Kumanogoh A, Zhao B, Kikutani H, Kieff E, Gewurz BE, Yasui T. Mouse model of Epstein-Barr virus LMP1- and LMP2A-driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 2;114(18):4751-4756. doi: 10.1073/pnas.1701836114. Epub 2017 Mar 28.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「特殊な血液製剤や遺伝子組換え製剤の製造等に関する研究」、口頭、古田里佳、佐竹正博、平成 28 年第 1 回輸血合同班会議（東京）、2016/6/11、国内。

2. 「The latest in hepatitis B and C」、口頭（教育講演）、佐竹正博、34th International Congress of the ISBT（ドバイ）、2016/9/4、国外.
3. 「Blood regulation affaires in Japan」、口頭（教育講演）、佐竹正博、Laboratory Medicine Congress & Exhibition（韓国 ソウル）、2016/10/28、国外.
4. 「Haemovigilance improving blood safety」、口頭（教育講演）、佐竹正博、Workshop on Hemovigilance and Effective Transfusion（中国 胡南）、2016/11/3、国外.
5. 「Luciferase Immunoprecipitation system (LIPS)法を用いた国内献血者における EBV 抗体陰性率の解析」、ポスター、古田里佳、安居輝人、河敬世、第 64 回日本ウイルス学会学術総会(札幌)、2016/11/23、国内.
6. 「Incidence of Human T-Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1) Infection in Adolescent and Adult Blood Donors in Japan: A Nationwide Retrospective Cohort Analysis」、口頭、M. Satake、I. Iwanaga、Y Sagara、T. Watanabe、K. Okuma、I. Hamaguchi. 18th International Conference on Human Retrovirology : HTLV and Related Viruses (Tokyo)、2017/3/7、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし