

インフルエンザウイルス感染に対する 中和抗体遺伝子を用いた予防・治療法の検討

山崎 達也^{1,2)}, 千葉 丈²⁾, 高村 (赤司) 祥子¹⁾

¹⁾愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

²⁾東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻

Neutralizing antibodies induced by gene-based injection have a prophylaxis/therapeutic effect in influenza infection

Tatsuya Yamazaki^{1,2)}, Joe Chiba²⁾, Sachiko Akashi-Takamura¹⁾

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Aichi Medical University

²⁾Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science

Abstract

Classical passive immunization has provided the benefit to prevent against infectious diseases for over century. Although lots of antibody-drugs have been developed for cancer and autoimmune disease, those against infectious disease are rarely available. Because it has complex reasons including the current availability of antimicrobial drugs, small markets, high costs, and microbial antigenic variation.

We firstly demonstrated long-prophylaxis against influenza virus (A/Puerto Rico/8/34, IAV) using plasmids encoding neutralizing IgG monoclonal antibodies. Antibody gene-based injection could induce stable and high expression level of the neutralizing antibodies, which was possible that single inoculation protected the mice against a lethal dose of IAV infection. We proposed that this method could dissolve problems of high cost to the purification, limited supply for pandemic, and the risk of using viral vectors.

We also succeeded to treatment against IAV infection using antibody gene-based injection by hydrodynamics (HD), which was involving rapid inoculation of a large volume of plasmid-DNA solution into mice via the tail vein. HD could rapidly induce the potent level of neutralizing antibodies in the serum within 24 hours. We demonstrated that a single HD completely protected the mice even after a lethal dose of IAV infection. Finally, we also generated other isotypes of antibody-gene to exchange from IgG to IgA, IgM, IgD, and IgE to retain the variable region. The neutralizing IgA was most effective at reducing upper respiratory tract IAV infection. Thus, our passive immunotherapy could provide a new prophylaxis/therapeutic strategy of targeting IAV infection.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 7~11, 2018

Key words : passive immunotherapy, Antibody gene delivery, electroporation, hydrodynamic injection, Influenza virus

はじめに

病原体の感染によって宿主の自然免疫系が活性化され、続いて獲得免疫が誘導される。しかし、それだけでは対処できない感染症も多く存在する。中和抗体そのものを投与する受動免疫法は、それら感染症制御の有効な手段の一つである。その有効性は、北里らの抗毒

素血清療法成功から歴史的に証明されている。しかし、現在認可されている感染症分野の抗体医薬は、RSウイルスを予防するものだけである¹⁾。開発が進まない原因の一つとして、高いコストや効果の維持には複数回投与が必要であることがあげられる。そこで近年、新しい受動免疫法の一つとして、従来のタンパク抗体ではなく“抗体遺伝子”を用いた受動免疫で感染症を予

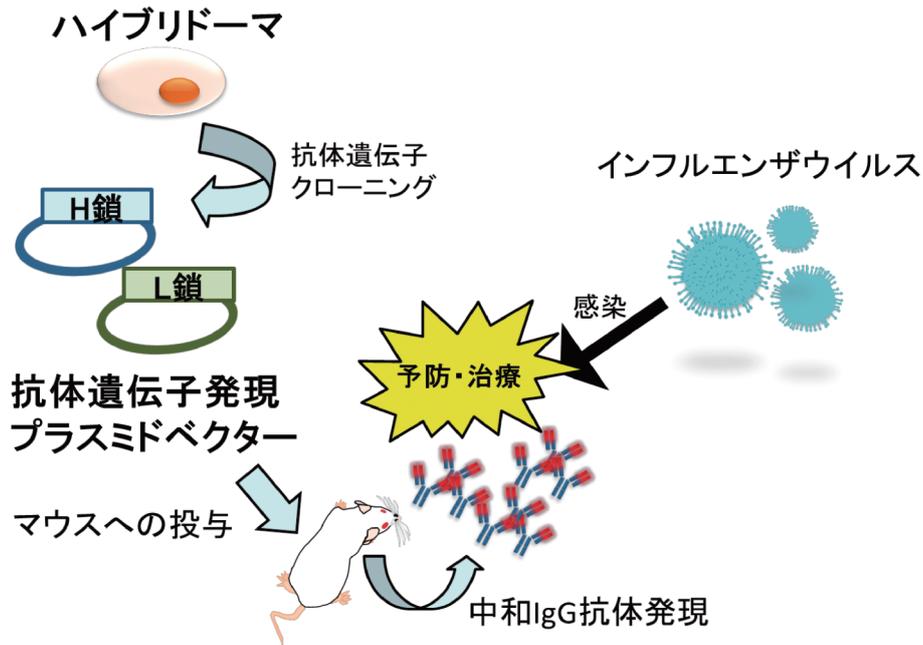


図 1 抗体遺伝子投与によるインフルエンザウイルス感染防御の模式図

インフルエンザウイルス中和 IgG 抗体を産生するハイブリドーマから H 鎖、L 鎖の遺伝子をクローニングし、それぞれ発現プラスミドベクターに組み込んだ。ベクターをマウスに投与し、生体内から発現した中和抗体がインフルエンザウイルスを防御できるか検討した。

防したという研究が報告されている²⁾。本稿では、われわれの研究を中心に、抗体遺伝子を用いた受動免疫法による感染症の制御と課題について概説したい。

1. 抗体遺伝子とは

従来の低分子化合物に比べ、抗体医薬は特異性が高いので効果が強く副作用も低いという特徴がある。それゆえとくに癌や自己免疫疾患の分野で多くの抗体医薬品が開発されている¹⁾。主な抗体医薬品は、大量の培養細胞にタンパク抗体を発現させ、それを精製してつくられている。その製造コストが高いことは課題の一つとなっている³⁾。また通常の抗体をヒトに投与した場合、その半減期は数日間とされている³⁾。つまり効果を持続するためには繰り返し投与する必要がある。それらの課題を解決する方法の一つとして、抗体遺伝子による受動免疫法が研究されている。具体的には、抗体を発現する遺伝子を生体内に投与し、その遺伝子から発現した抗体によって予防や治療効果を得る方法である。抗体遺伝子を用いるメリットとして、タンパク抗体よりも製造コストが安価であることがあげられる。大腸菌で製造するので容易に大量培養・精製が可能でありコストが安価となることが期待される。さらに遺伝子からの持続的な抗体発現を期待できるので、投与回数を減らせることが期待できることもメリットの一つである。

2. 抗体遺伝子投与による感染症予防について

2-1. 非ウイルスベクターによる抗体遺伝子投与

われわれは世界に先がけて、抗体遺伝子の単回投与で約3カ月の長期的なインフルエンザの予防に成功した⁴⁾。まずインフルエンザウイルス中和 IgG 抗体を産生するハイブリドーマから H 鎖遺伝子、L 鎖遺伝子をそれぞれ組み込んだプラスミドベクターを作製した(図1)。そのプラスミドをマウスの大腿筋にエレクトロポレーション法で投与した結果、血中に $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度の中和抗体が持続的に安定して発現することを確認した。そこで実際に抗体遺伝子投与マウスにウイルスを感染させ、予防効果があるか解析を行った。インフルエンザウイルス感染方法は2種類あり、肺(下気道)感染は致死モデルであり、鼻腔(上気道)感染は粘膜局所の感染モデルである。遺伝子投与後、抗体発現がピークとなる20日目に致死量のウイルスを肺感染させた結果、肺洗浄液中のウイルス価は有意に減少した。また感染による体重減少もみられず、すべてのマウスが生存した。さらに遺伝子投与後130日目にウイルス感染させた場合でも、有意にウイルス価の減少が認められた。これらの結果より、抗体遺伝子による受動免疫は長期的なウイルス感染の予防効果があることが分かった。タンパク抗体の半減期が数日であることを考える

と有効な方法であると言える。さらに非ウイルスベクターを用いたことで、安全性も高い方法であると考えられる。他にプラスミドベクターを用いて抗体遺伝子を投与した報告では、Weinerのグループでデングウイルス、チクングニアウイルスに対する感染予防に成功している^{5,6)}。彼らも、エレクトロポレーション法による抗体遺伝子の単回投与で1カ月以上のチクングニアウイルスの感染予防効果を示している⁶⁾。以上より非ウイルスベクターでも十分な感染予防効果があると考えられる。

2-2. ウイルスベクターによる抗体遺伝子投与

ウイルスベクターを用いた場合、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに抗体遺伝子を組み込んで発現させている報告が多い²⁾。AAVは、宿主ゲノムに組み込まれず自己複製もしない安全なウイルスベクターとして用いられている。感染細胞で長期的に保持されるので目的の抗体を数カ月～数年にわたり発現させることが可能である⁷⁾。AAVに抗体遺伝子を組み込んでマウスへの単回投与もしくは複数回投与で長期的な予防効果を示している報告は、エイズウイルス(HIV)、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス(HCV)、RSウイルス、マラリア、炭疽菌がある²⁾。また、インフルエンザウイルスやHIVなどは抗原変異が激しく、宿主免疫を回避することが問題となっている。そのような変異ウイルスにも効果があるように、各株間の中和エピトープが保存されている中和抗体を発現する遺伝子が用いられている²⁾。

2-3. 抗体遺伝子を組み込むベクターの工夫

抗体遺伝子の発現方法に関して、口蹄疫ウイルス由来の自己開裂ペプチド(2Aペプチド)でH鎖遺伝子とL鎖遺伝子を連結することで、1種類のプラスミドベクターにすることが可能である⁸⁾。遺伝子からはH鎖とL鎖が連結した状態でタンパクが発現し、その後2Aペプチドで自己開裂するため、H鎖、L鎖がそれぞれ独立した構造をとり、最終的に結合して一つの抗体を形成する。よってベクターは1種類となるので、抗体遺伝子の調整もより簡便化される。

3. 抗体遺伝子による感染症治療の検討

3-1. 感染症の治療について

感染症制御のためには新たな治療法開発も重要な課題である。それは、すでに病原体に感染した患者に対してワクチンでは迅速な治療は困難であるからである。インフルエンザでは抗ウイルス薬が治療の中心となっている。薬剤耐性ウイルス出現も問題となっているが、複数のウイルス薬の開発によって、その対策が行われている。2018年には、これまでとは作用機序の異なる

ウイルス薬(商品名:ゾフルーザ)が認可され、さらに治療の選択肢が増えた。また、それまで治療困難であったHCVも、近年認可された抗ウイルス薬により治療効果が飛躍的に上昇した。現在では、ほぼ100%のウイルス排除効果が認められている⁹⁾。このように有効な抗ウイルス薬の開発は、それまで治療困難であった感染症を克服できる可能性がある。

3-2. 抗体遺伝子による感染症治療の意義と戦略

抗ウイルス薬の開発は目覚ましいものがあるが、エボラウイルスや狂犬病ウイルスなどいまだに有効な抗ウイルス薬が開発されていない感染症も多く存在する。低分子化合物による抗ウイルス薬は、膨大な数のスクリーニングにより開発されている。一方で、医薬品全体として上市に至った割合は、低分子化合物では約5%であるのに対し、抗体医薬では約20%であったという報告もされている¹⁰⁾。すでに述べたように抗体医薬は特異性が高く、また自己タンパクであるので副作用は低いことが大きな利点である。以上のことから、抗体医薬で感染症を治療することは、開発効率と治療効果が高いことが期待される。そこでわれわれは、インフルエンザを感染症のモデルとし、抗体遺伝子を用いた受動免疫でインフルエンザを治療できるか検討することにした。

宿主はすでにウイルスに感染しているので、治療において重要なことは即効性である。つまり遺伝子投与後、迅速かつ高レベルの中和抗体を宿主に導入することが重要である。そこでハイドロダイナミクス法という遺伝子導入法を検討した。ハイドロダイナミクス法とは、マウス全血液量とほぼ同量のプラスミド溶液を尾静脈から数秒で投与することで、細胞に水力学的な圧力をかけて一過性に細胞膜に穴をあけ、細胞内に遺伝子を取り込ませる方法である¹¹⁾。主な遺伝子発現組織は肝臓で、短時間に高レベルの遺伝子発現が得られるという特徴がある¹¹⁾。この方法で抗体遺伝子を投与した結果、遺伝子投与後4時間から血中に抗体が検出され始め、24時間後では10 μ g/mL以上の抗体が検出された(図2)¹²⁾。一方で、エレクトロポレーション法では投与後24時間以内においては、有意なレベルで血中に抗体は検出されなかった。これよりハイドロダイナミクス法で抗体遺伝子を投与することで、迅速かつ高レベルの抗体を血中に誘導できることが分かり、インフルエンザの治療効果が期待された。

3-3. 抗体遺伝子による致死性インフルエンザウイルス感染に対する治療

まず致死量のウイルスをマウスに肺感染させ、感染1日後に抗体遺伝子を投与し、さらに感染3日後に肺洗浄液を回収した。肺洗浄液中のウイルス価をプラーク

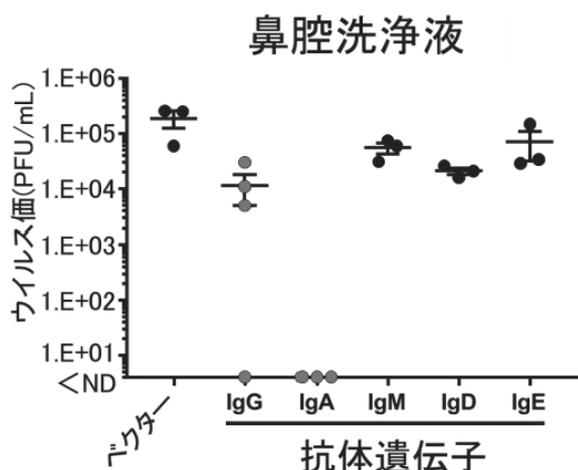


図5 抗体遺伝子投与によるインフルエンザ（鼻腔感染）の治療

マウスにインフルエンザウイルスを鼻腔感染させた。感染8時間後に、各アイソタイプ抗体を発現する抗体遺伝子を投与し、感染3日後に鼻腔洗浄液中のウイルス価をプラーク法で測定した。（文献¹²⁾を改変）

作製した抗体遺伝子をそれぞれハイドロダイナミクス法でマウスに投与した結果、血中にすべてのアイソタイプ抗体の発現を確認できた。つづいてマウスにウイルスを感染させ、治療効果が認められるか解析を行った。まず肺感染モデルにおいて、IgG以外のアイソタイプでは肺洗浄液中の有意なウイルス価の減少は認められなかった。次に鼻腔（上気道）感染モデルでは、IgGに加え、IgA抗体遺伝子を投与した場合でも鼻腔洗浄液中のウイルス価は有意に減少した（図5）¹²⁾。さらにIgA抗体遺伝子では、そのレベルはほぼ検出限界以下のレベルであった。この結果より、ウイルスの鼻腔粘膜感染に対しては、IgA抗体遺伝子の治療効果が高いことが示唆された。インフルエンザウイルスは通常、鼻腔粘膜に感染するので、IgA抗体遺伝子の投与はインフルエンザの治療において有効な方法であると考えられた。

おわりに

中和抗体を投与する受動免疫法は、ワクチンや抗ウイルス薬がない感染症において、予防・治療の両方で効果的であると考えられる。インフルエンザウイルスやHIVでは変異ウイルスにも対応できるように、株間で保存されているエピトープに対する中和抗体のクローニングが盛んに行われている。一方で、抗体医薬のコストや効果の持続性を考慮すると、抗体遺伝子による

受動免疫法は魅力的な方法である。しかし遺伝子治療の大きな課題は、安全に遺伝子を導入する方法の開発である。エレクトロポレーション法やハイドロダイナミクス法ではヒトにおける侵襲性が高いと考えられ、すぐに臨床応用できる治療法とは言い難い。安全でかつ簡便な非侵襲性の遺伝子導入法が開発されれば、われわれの研究も含めて抗体遺伝子研究は、抗体医薬の感染症への応用に大きく貢献できると考えている。

文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部：これまでに日米欧で認可された抗体医薬品，2018 (<http://www.nihs.go.jp/dbcb/mabs.html#m02>)
- 2) Sanders JW, Ponzio TA : Vectored immunoprophylaxis : an emerging adjunct to traditional vaccination. Trop Dis Travel Med Vaccines 3 : 3, 2017
- 3) 関根進 : 抗体医薬の現状と課題. 科学技術動向 103 : 13-25, 2009
- 4) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, et al. : Passive immune-prophylaxis against influenza virus infection by the expression of neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids. Jpn J Infect Dis 64 : 40-49, 2011
- 5) Flingai S, Plummer EM, Patel A, et al. : Protection against dengue disease by synthetic nucleic acid antibody prophylaxis/immunotherapy. Sci Rep 5 : 12616, 2015
- 6) Muthumani K, Block P, Flingai S, et al. : Rapid and Long-Term Immunity Elicited by DNA-Encoded Antibody Prophylaxis and DNA Vaccination Against Chikungunya Virus. J Infect Dis 214 : 369-378, 2016
- 7) Yang L, Wang P : Passive immunization against HIV/AIDS by antibody gene transfer. Viruses 6 : 428-447, 2014
- 8) Fang J, Qian JJ, Yi S, et al. : Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. Nat Biotechnol 23 : 584-590, 2005
- 9) 日本肝臓学会肝炎診療ガイドライン作成委員会 : C型肝炎治療ガイドライン（第6.1版），2018
- 10) 川西徹 : 抗体医薬の現状と展望. 日薬理誌 131 : 102-108, 2008
- 11) Liu F, Song Y, Liu D : Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Ther 6 : 1258-1266, 1999
- 12) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, et al. : Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection. Front Immunol 9 : 47, 2018